



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

## FENOTIPO, ANATOMÍA, E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y METABÓLICA DE INVERTASAS, EN EL CICLO DIURNO-NOCTURNO, DE FRUTOS EN RACIMO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) CON RESTRICCIÓN DE HUMEDAD

KARLA CHAVEZ MENDOZA

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **FENOTIPO, ANATOMÍA, E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y METABÓLICA DE INVERTASAS, EN EL CICLO DIURNO-NOCTURNO, DE FRUTOS EN RACIMO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Con Restricción De Humedad**, realizada por el (la) estudiante: **KARLA CHAVEZ MENDOZA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Daniel Padilla Chacón

ASESORA

Dra. Cecilia Beatriz Peña

ASESORA EXTERNA

Dra. Martha Hernández Rodríguez

SINODAL

Dr. Víctor E. Conde Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2022

# FENOTIPO, ANATOMÍA, E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y METABÓLICA DE INVERTASAS, EN EL CICLO DIURNO-NOCTURNO, DE FRUTOS EN RACIMO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Con Restricción De Humedad

Karla Chavez Mendoza, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

El pericarpio es esencial para la protección y formación de semillas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). El objetivo del presente estudio fue describir el efecto de la restricción de humedad en el fenotipo, anatomía, fisiología, bioquímica y expresión de invertasas en racimos de frutos, con diferente tamaño y fuerza de demanda en plantas de frijol (*P. vulgaris*). La hipótesis planteada es que existen diferencias metabólicas en los pericarpios de frutos con distinto número de semillas en desarrollo. Plantas del cultivar OTI se cultivaron en invernadero con riego. En la etapa R8, o de llenado de la vaina, se formaron dos grupos, uno se continuó regando (100 % capacidad de campo, CC) y a otro se le disminuyó en 50 % de capacidad campo durante diez días. El análisis de fenotipo en imágenes RGB mostró que las plantas en 50 % CC, después de 10 días, presentaron síntomas severos de senescencia en las hojas ya que perdieron totalmente el color verde mantuvieron los frutos verdes y permanecieron así varios días. En los racimos de vainas, la funcionalidad estructural de las vainas largas y cortas se demostró anatómicamente, en cortes histológicos. No se observaron diferencias entre las vainas de las plantas con 50 y 100 % CC. Las concentraciones de glucosa y almidón en pericarpios largos y cortos se mantuvieron disminuidos, respecto a fructosa y sacarosa en el ciclo diurno-nocturno, independientemente del nivel de humedad. Las concentraciones de sacarosa en frutos largos aumentó 15 % a medio día. En contraste, con 50 % CC los niveles de sacarosa se mantuvieron elevados a lo largo del día y los de fructosa disminuidos. La actividad enzimática de invertasa de pared celular (PC) fue 10-15 % mayor en frutos cortos en ambos niveles de humedad. Este resultado no se observó en las invertasas vacuolar o citosólica. El análisis bioinformático mostró que en el genoma de *P. vulgaris* existen seis posibles genes que codifican a invertasas de PC. La homología de aminoácidos mostró que la secuencia codificadora en los genes PvCWINV3 y PvCWINV4 tienen diferencias en motivos relacionados con la catálisis y relación filogenética con dicotiledóneas. Los niveles de transcritos, determinados por RT-qPCR, mostraron que los niveles de transcrito del gen PvCWINV4 fueron 20 % mayores en frutos cortos cosechados de plantas con 50 % CC respecto a los frutos cortos de plantas en riego. El metabolismo de la sacarosa difiere entre frutos del frijol con diferente número de semillas, durante el llenado de la semilla.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris* L, vaina, racimos, sacarosa, invertasa de pared.

**PHENOTYPE, ANATOMY, AND MOLECULAR AND METABOLIC IDENTIFICATION  
OF INVERTASES, IN THE DIURNAL-NIGHT CYCLE, OF FRUIT CLUSTERS OF  
BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) WITH MOISTURE RESTRICTION**

**Karla Chavez Mendoza, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022**

**ABSTRACT**

The pericarp is essential for the protection and formation of seeds in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). The objective of the present study was to describe the effect of moisture restriction on the phenotype, anatomy, physiology, biochemistry and expression of invertases in fruit bunches, with different size, and force of demand in bean plants (*P. vulgaris*). The proposed hypothesis is that there are metabolic differences in the pericarps of fruits with different numbers of developing seeds. Plants of the OTI cultivar were grown in a greenhouse with irrigation. In stage R8, or pod filling, two groups were formed, one continued to irrigate (100 % field capacity, CC) and the other one was reduced to 50 % field capacity for ten days. The phenotype analysis in RGB images showed that the plants at 50 % CC, after 10 days, presented severe symptoms of senescence in the leaves, since they completely lost the green color, they kept the fruits green, and remained so for several days. In pod clusters, the structural functionality of long and short pods was demonstrated anatomically, in histological sections. No differences were observed between the pods of the plants with 50 and 100 % CC. Glucose and starch concentrations in long and short pericarps remained low, compared to fructose and sucrose in the day-night cycle, regardless of humidity level. Sucrose concentrations in long fruits increased 15 % at noon. In contrast, with 50% CC, sucrose levels remained high throughout the day, and fructose levels decreased. Cell wall invertase (CP) enzyme activity was 10-15 % higher in short fruits at both moisture levels. This result was not observed in vacuolar or cytosolic invertases. Bioinformatic analysis showed that in the *P. vulgaris* genome there are six possible genes encoding PC invertases. Amino acid homology showed that the sequence encoded in the PvCWINV3 and PvCWINV4 genes have differences in motifs related to catalysis and phylogenetic relationship with dicots. The transcript levels, determined by RT-qPCR, showed that the transcript levels of the PvCWINV4 gene were 20% higher in short fruits harvested from plants with 50% CC compared to short fruits from irrigated plants. Sucrose metabolism differs between bean fruits with different number of seeds, during seed filling.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris* L, pod, clusters, saccharose, wall invertase.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber financiado mis estudios de maestría a través de una beca; al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por abrirme las puertas para crecer profesionalmente y al posgrado de Botánica por expandir mi conocimiento.

Al Dr. Daniel Padilla Chacón por guiarme durante la formación de mi maestría, por el apoyo, comprensión y paciencia durante la misma;

A la Dra. Martha Hernández Rodríguez por su paciencia y guía en el desarrollo de los experimentos;

A la Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia por sus consejos y paciencia durante la formación de mi maestría;

A mi Consejo Particular, por el apoyo absoluto, el tiempo y dedicación que me han brindado para hacer posible la realización de este proyecto;

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida de la UNAM, por facilitarme material empleado en este trabajo y por sus comentarios en el mismo;

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas de la UNAM, por la amabilidad de sus comentarios en los resultados y sugerencias;

A la Dra. Karina Jiménez Durán de la UNAM, por su tiempo, disponibilidad y por permitirme trabajar en su laboratorio;

Al Dr. Víctor Conde Martínez por formar parte de mi comité evaluador y por la revisión de la tesis;

A la Mtra. Norma Cecilia Morales Elias, compañera por tus consejos, experiencias y apoyo en el camino a la realización de mi maestría;

Al Mtro. Antonio García Esteva por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados durante mi maestría.

## **DEDICATORIA**

A mi abuelita con mucho amor y cariño

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTAS DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	5
2.1. Objetivo General .....	5
2.2. Objetivos específicos .....	5
2.3. Hipótesis .....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA .....	7
3.1. Frutos de frijol .....	7
3.1.1. Llenado de la semilla .....	8
3.1.2. Composición de moléculas de reserva en semillas del frijol .....	10
3.1.3. Papel de la vaina como tejido de reserva .....	11
3.1.4. Fotosíntesis en vainas de leguminosas .....	13
3.1.5. El papel de la vaina en plantas de frijol en respuesta al estrés por baja disponibilidad de agua .....	13
3.2. Metabolismo de sacarosa en tejidos fotosintéticos .....	15
3.2.1. Metabolismo de sacarosa en tejidos no fotosintéticos .....	18
3.2.2. Invertasas en plantas .....	20
3.2.2.1. Invertasas solubles .....	21
3.2.2.2. Invertasas insolubles .....	21

3.2.3.	Respuesta de las invertasas al estrés abiótico.....	22
3.2.4.	Metabolismo de almidón en tejidos fotosintéticos .....	24
3.2.5.	Azúcares en la señalización y estrés .....	27
3.2.6.	Genoma del frijol y la base de datos Phytozome .....	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1.	Material vegetal.....	31
4.2.	Diseño experimental .....	31
4.3.	Etiquetado de flores .....	32
4.4.	Fenotipaje en imágenes RGB.....	33
4.5.	Anatomía del pericarpio .....	34
4.6.	Producción de biomasa .....	34
4.7.	Concentración de azúcares solubles y almidón .....	35
4.7.1.	Azúcares solubles .....	35
4.7.2.	Almidón .....	36
4.8.	Actividad de invertasas solubles e insolubles .....	37
4.9.	Identificación de secuencias de invertasas de pared celular .....	38
4.10.	Diseño de oligonucleótidos .....	39
4.11.	Análisis bioinformático y filogenético .....	39
4.12.	Extracción de RNA.....	40
4.13.	PCR en tiempo real.....	41
4.14.	Análisis estadístico .....	43
V.	RESULTADOS .....	44
5.1.	Pérdida de humedad en el sustrato .....	44

5.2.	Determinación no destructiva del fenotipo con imágenes en RGB .....	45
5.3.	Anatomía de los pericarpios de plantas en suelo con 100 % y 50 % CC.....	47
5.4.	Producción de frutos y peso de semillas.....	49
5.5.	Variación diaria de los niveles de azúcares solubles y almidón en las valvas .....	51
5.6.	Actividad enzimática de invertasas .....	54
5.7.	Identificación de secuencias de genes de invertasas de pared celular en el genoma de <i>P. vulgaris</i> .....	56
5.8.	Alineamiento de secuencias de invertasas de pared celular e identificación de motivos .....	60
5.9.	Análisis filogenético de secuencias de invertasas .....	62
5.10.	Determinación de los niveles de transcritos de los genes PvINVCW3 y PvINVCW4 por RT-qPCR .....	62
VI.	DISCUSIÓN GENERAL.....	67
6.1.	Fenotipo y anatomía de los racimos de frutos de plantas con y sin restricción de humedad.....	67
6.2.	Producción de frutos y semillas .....	68
6.3.	Azúcares solubles y almidón .....	69
6.4.	Actividad enzimática de invertasas.....	71
6.5.	Análisis bioinformático de invertasas de pared celular en el genoma de frijol .....	73
VII.	CONCLUSIÓN.....	75
VIII.	LITERATURA CITADA .....	76

## LISTAS DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> <i>Características físicas y químicas del suelo agrícola de la región de Texcoco. Estado de México</i> .....	32
<b>Cuadro 2.</b> <i>ID de invertasas de plantas vasculares</i> .....	57
<b>Cuadro 3.</b> <i>ID de invertasas de pared celular y porcentaje de similitud de las familias con Phaseolus vulgaris</i> .....	59
<b>Cuadro 4.</b> <i>Oligonucleótidos específicos de genes utilizados para ensayos cuantitativos de RT-PCR</i> .....	59
<b>Cuadro 5.</b> <i>Información detallada de los genes de la familia CWINV del frijol</i> .....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción general del metabolismo del carbono en los tejidos fuente (hoja) y demanda (semilla).....	17
<b>Figura 2.</b> Presentación simplificada del metabolismo de azúcares en las células del tejido demanda hacia la síntesis de celulosa, calosa y almidón.....	19
<b>Figura 3.</b> Vías de síntesis y degradación del almidón en hojas de <i>Arabidopsis</i> . ....	25
<b>Figura 4.</b> Representación de los estados fenológicos del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.), ajustada al cv. OTI. ....	33
<b>Figura 5.</b> Pérdida de humedad diaria en suelo agrícola con plantas de frijol cv. OTI en etapa R8.....	44
<b>Figura 6.</b> (A). Imágenes en RGB de plantas de frijol cv. OTI en suelo con 100% CC y 50% CC durante 10d analizadas por segmentación de color. ....	46
<b>Figura 7.</b> Análisis morfológico de pericarpios de vainas (largas y cortas) .....	48
<b>Figura 8.</b> A. Racimos de vainas (frutos largos y cortos) de frijol cv. OTI .....	50
<b>Figura 9.</b> Concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón $\pm$ EE en pericarpios de vainas (largas (triángulo) y cortas (círculo)) .....	53
<b>Figura 10.</b> Actividades de invertasas de pared, citosólica y vacuolar en pericarpios de vainas (largas (triángulo) y cortas (círculo)) de racimos de plantas con 100 % de capacidad de campo (CC) (A, C y D) y 50% de CC (B, D y F) durante 10 días. ....	55
<b>Figura 11.</b> Alineamiento de secuencias de aminoácidos de invertasas de <i>Phaseolus vulgaris</i> . ....	61

**Figura 12.** Árbol filogenético construido con el método NJ, con el programa MEGAX  
5.2.2, basado en secuencias proteicas de *Phaseolus vulgaris*. ..... 64

**Figura 13.** Perfiles de expresión de RT-qPCR de los genes de invertasa de  
*Phaseolus vulgaris* *CWINV3* y *CWINV4* en valvas largas y cortas. .... 65

**Figura 14.** Modelo representativo de las vías múltiples del metabolismo del carbono  
de racimos al 100 % capacidad de campo (CC) y 50 % CC. .... 66

## I. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de mayor consumo en países del Norte de África y Latinoamérica (Beebe *et al.*, 2013). Estudios sobre la formación temporal y espacial de flores y vainas en desarrollo indican que el número de flores que originaran frutos depende de la cantidad de fotoasimilados que son transportados en el floema; lo que deriva en el desarrollo de las vainas, en el llenado de las semillas y por lo tanto para el rendimiento (Clavijo *et al.*, 2013). En cultivares arbustiformes, con hábito de crecimiento tipo I (CIAT, 1985), las inflorescencias normalmente producen de manera simultánea racimos organizados en unidades de 2 o 3 frutos (CIAT, 1992); esto genera competencia entre las estructuras de las vainas, diferencias en su desarrollo y en el número de semillas por vaina.

El déficit de humedad es el principal factor abiótico generador de estrés que afecta a la producción de frijol (Hageman *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2020; Berny *et al.*, 2019). Las pérdidas en el rendimiento, por este factor, pueden ser totales si el déficit hídrico se presenta en la etapa reproductiva (Morales-Elias *et al.*, 2021; Beebe *et al.*, 2013). El déficit de humedad provoca aumento de la concentración de sacarosa en el floema; esto disminuye significativamente la descarga fotoasimilados, impacta negativamente en el número de flores y frutos en desarrollo y genera numerosas estructuras reproductivas abortadas (Yoon *et al.*, 2021; Leonardos *et al.*, 2006). Los frutos que permanecen en la planta, pueden completar el llenado de sus semillas, con tamaño y peso similares a las cosechadas de plantas con riego (Morales-Elias *et al.*, 2021; Padilla-Chacón *et al.*, 2017); es decir, la acumulación de biomasa se mantiene constante incluso cuando la relación fuente-demanda cambia.

Experimentalmente se demostró que en leguminosas el pericarpio protege a las semillas y aporta cantidades abundantes de carbono en condiciones ambientales adversas (Bennet *et al.*, 2011). En alfalfa (*Medicago sativa*) (Wang *et al.*, 2020), soya (*Glycine max*) (Sengupta *et al.*, 2019), chícharo (*Pisum sativum*) (Atkins y Pate, 1977), cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Furbackr *et al.*, 2004) y *Brassica* se ha demostrado que el pericarpio aporta carbono al grano, durante su desarrollo, cuando la actividad fotosintética en las hojas es limitada (Chopra *et al.*, 2003). Recientemente se demostró que las plantas de frijol de algunos cultivares, en restricción de humedad por 18 días, mantienen las vainas verdes. Esto permitió sugerir que, la respuesta al estrés hídrico podría estar relacionada con la capacidad del cultivar de mantener verdes los frutos, respuesta conocida en inglés como "Stay green" (Cayetano-Marcial *et al.*, 2021) y que las vainas son fotosintéticamente activas y capaces de sintetizar fotoasimilados.

Evidencias experimentales indican que el almidón almacenado en el parénquima lo utilizan los frutos como fuente de carbono, alternativo al proporcionado por los fotoasimilados foliares, cuando el llenado de la semilla está comprometido por estrés por déficit hídrico (Coello y Martínez- Barajas, 2014). Cuellar *et al.*, (2008) demostraron que el almidón en el pericarpio se incrementa en respuesta a la sequía; pero, hasta el momento no hay evidencias de que los productos de la degradación del almidón sean asimilados por las semillas.

Dado que la sacarosa es un potente regulador del desarrollo de tejidos de demanda (Yoon *et al.*, 2021), el conocimiento del metabolismo de la sacarosa en los frutos de frijol aportará evidencia del papel de la sacarosa en el llenado de la semilla y en la respuesta al estrés por restricción de humedad. El impacto de la actividad

enzimática de invertasas se ha descrito en el desarrollo de frutos de jitomate (Proels y Roitsch, 2009) y maíz (Juárez Colunga *et al.*, 2018). Particularmente, la invertasa de pared celular regula los niveles de sacarosa cuando la descarga es apoplástica, la actividad de esa invertasa se correlaciona con la expresión del transportador de sacarosa SUT1 (Al-Sheikh *et al.*, 2018) y con la presencia de ABA en plantas con restricción de humedad (Wingler y Roitsch, 2008).

Específicamente, en frijol es común la formación y desarrollo de frutos con diferente número de semillas y las diferencias se acentúan con el estrés por restricción de humedad (Cayetano-Marcial *et al.*, 2021); por lo que, es una especie adecuada para avanzar en el conocimiento del metabolismo de la sacarosa en esos frutos, su variación durante el ciclo diurno-nocturno y su modificación por efecto del déficit de humedad. Así, el objetivo de la presente investigación fue describir el efecto de la restricción de humedad en el fenotipo, anatomía, fisiología, bioquímica y expresión de invertasas en racimos de frutos, con diferente tamaño y fuerza de demanda en plantas de frijol (*P. vulgaris*).

Para esto, se utilizaron métodos de fenotipaje, bioquímicos, anatómicos y moleculares, incluidas las cuantificaciones de los niveles de azúcares soluble y almidón y su relación con la actividad enzimática de invertasa de pared celular (INVCW), citosólica (INVC) y vacuolar (INVV), así mismo, la identificación de sus secuencias en el genoma de frijol, la relación filogenética basada en la secuencia de aminoácidos y niveles de expresión determinados por RT-qPCR. Por lo que, la hipótesis del presente estudio fue “el déficit hídrico afecta desigualmente la distribución de carbono y fuerza de demanda en los frutos, largos y cortos, en racimos de frijol (*P. vulgaris*) durante el ciclo

diurno-nocturno” y como objetivo general describir el efecto de la restricción de humedad en el fenotipo, anatomía, fisiología, bioquímica e identificación de genes en racimos de frutos, con diferente tamaño y fuerza de demanda en plantas de frijol (*P. vulgaris*).

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. Objetivo General

Describir el efecto de la restricción de humedad en el fenotipo, anatomía, fisiología, bioquímica y expresión de invertasas en racimos de frutos, con diferente tamaño y fuerza de demanda en plantas de frijol (*P. vulgaris*).

### 2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el fenotipo, con imágenes RGB, relacionado con el nivel de senescencia en plantas en R8, llenado de la semilla, mantenidas con y sin restricción de humedad (50 % CC y 100 % CC).
- Analizar la anatomía, en cortes transversales, de frutos largos y cortos en racimos de plantas mantenidas con y sin restricción de humedad (50 % CC y 100 % CC).
- Determinar los cambios diurnos-nocturnos en la concentración de azúcares solubles y almidón en frutos largos y cortos, en racimos, de plantas mantenidas con y sin restricción de humedad (50 % CC y 100 % CC).
- Cuantificar la actividad enzimática de invertasas de pared celular (CWINV), citosólica (CINV) y vacuolar (VINV) dependiente del ciclo diurno-nocturno en racimos de frutos, largos y cortos, de plantas mantenidas con y sin restricción de humedad (50 % CC y 100 % CC).
- Identificar en el genoma de frijol reportado en Phytozome secuencias de genes que codifican a genes de invertasa CWINV.
- Realizar alineamientos de secuencia de aminoácidos con el programa Clustal X y árbol filogenético con MEGA X.

- Evaluar mediante RT-qPCR los niveles de expresión de las secuencias de genes que tengan mayor similitud con los genes de invertasas reportados previamente.

### **2.3. Hipótesis**

El déficit hídrico afecta desigualmente la distribución de carbono y fuerza de demanda en los frutos, largos y cortos, en racimos de frijol (*P. vulgaris*) durante el ciclo diurno-nocturno.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Frutos de frijol

*Phaseolus vulgaris* es la especie más distribuida y de mayor consumo del género *Phaseolus*, pertenece a la familia Fabaceae con aproximadamente 70 especies nativas de América con centros de origen andino y mesoamericano (Chacón *et al.*, 2005). El fruto del frijol, conocido comúnmente como vaina, es una hoja carpelar con dos valvas suavemente curvadas y dehiscentes, las cuales provienen del ovario comprimido; estas características del fruto permiten clasificar a la especie como leguminosa (SAGARPA, 2017). Las Inflorescencias están formadas por pocas flores dispuestas sobre pedúnculos más cortos que las hojas, ubicados en las axilas de las hojas; las flores también se acompañan de brácteas estriadas.

El cáliz, en las flores, es un tubo campanulado que hacia el ápice se divide en cinco lóbulos, los cuales están parcialmente unidos; la corola es color rosa-púrpura a casi blanca, con cinco pétalos desiguales; además, dos pétalos laterales similares, conocidos como alas, generalmente fusionados, que forman la quilla; la cual presenta ápice largo y torcido en espiral que envuelve a los estambres y al ovario (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>).

Los frutos en racimo se desarrollan a partir de la fase R5 (prefloración); en esta fase primero se expone el botón o racimo floral. Los órganos más prominentes en un racimo son las brácteas de forma triangular y las bractéolas de forma ovalada a redonda, en la axila de cada bráctea existe un complejo de yemas denominado tríada floral. En las

variedades con hábito de crecimiento determinado, el complejo axilar del último nudo presenta desarrollo floral de sus yemas; es decir, los botones florales se desarrollan de las dos yemas laterales y la yema central permanece en estado latente. A partir de este nudo, el ápice del tallo y de las ramas se transforma en racimo terminal. Los racimos se desarrollan a botones florales, que al crecer muestran pigmentación y adquieren su forma según la variedad, los botones florales presentan algunos abultamientos característicos y al final de este proceso se expone la flor (CIAT, 1992).

La morfología floral de *P. vulgaris* facilita el mecanismo de autopolinización ya que las anteras se encuentran en el mismo nivel que el estigma y ambos órganos se encuentran envueltos completamente por la quilla. De tal forma que cuando se produce la antesis (dehiscencia de las anteras) el polen cae directamente sobre el estigma fecundando la flor. una vez que la flor ha sido fecundada la corola se marchita y la vaina inicia su crecimiento (Arias *et al.*, 2007; CIAT, 1992).

La formación de la vaina inicia con el desarrollo de las valvas, durante los primeros 10 a 15 días; después de la floración, ocurre principalmente el crecimiento longitudinal de la vaina y existe poco crecimiento de las semillas. Cuando las valvas alcanzan su tamaño final y peso máximo, se inicia el llenado de las semillas (CIAT, 1992).

### **3.1.1. Llenado de la semilla**

En leguminosas la etapa de llenado de semilla se desarrolla mediante una coordinación compleja de actividades de proteínas, como enzimas que catalizan la síntesis de metabolitos y regulan la distribución de carbono; el tiempo de llenado de la vaina es más del doble que el que toma el llenado de semilla en cereales (Gallardo *et*

*al.*, 2008), lo que aumenta la probabilidad de exposición de los frutos a condiciones ambientales adversas durante más tiempo.

De acuerdo con Coelho y Benedito (2008) el desarrollo de la semilla de *P. vulgaris* sucede en tres fases: la primera incluye la histodiferenciación-embriogénesis en la que la diferenciación del embrión (a través de las etapas globular, corazón y torpedo), de los cotiledones y de la testa o cubierta se lleva a cabo; esta fase se da 12 días después de la polinización (Parreira *et al.*, 2016). En la segunda fase, la de maduración-llenado, aumenta rápidamente la biomasa y el crecimiento del embrión en los siguientes 30 días después de la antesis (DDA) (Parreira *et al.*, 2016). En la fase de maduración la semilla, cesa la acumulación de biomasa, inicia el proceso de deshidratación y latencia, esta fase se presenta entre los 30 DDA y hasta los 40 DDA (Matilla, 2016; Parreira *et al.*, 2016).

La velocidad y duración del llenado de las semillas determinan el rendimiento de los cultivos (Yin *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Actualmente, en leguminosas se desconoce el mecanismo molecular y bioquímico que define el llenado de la semilla. En cereales se conocen las vías de señalización que regulan el llenado de la semilla. En arroz (*Oriza sativa*) se describió que durante el llenado de la semilla participan proteínas de señalización conocidas como proteínas G (Li *et al.*, 2018). Además, estudios en QTLs permitieron identificar genes reguladores que controlan la expansión y proliferación de la semilla. Estos reguladores incluyen a la proteína MAPK quinasa y al proteosoma de ubiquitina (Li *et al.*, 2018).

Mediante técnicas de proteómica en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) en desarrollo se identificaron grupos de proteínas asociadas a la expansión y crecimiento

del grano (Zhang *et al.*, 2021). En el estudio destacó la abundancia de proteínas relacionadas con la síntesis de almidón como la sacarosa sintasa, la almidón fosforilasa, almidón sintasa soluble y enzimas unidas al almidón como la, piruvato fosfato dicinasa y la proteína 14-3-3. Estos resultados son evidencia de posibles modificaciones de las enzimas para mejorar la calidad de los cultivos e incrementar la tolerancia al estrés (Zhang *et al.*, 2021).

En frijol se han identificado por medio de una aproximación con el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), la abundancia de metabolitos y de proteínas a las que se ha asignado una categoría de acuerdo a su función y el total de proteínas que se expresan durante el desarrollo de las semillas (Parreira *et al.*, 2016). Así esos grupos funcionales de proteínas se han confirmado y falta explorar los mecanismos que definen el proceso molecular y bioquímico a través de los cuales los frutos y, en particular las vainas, reciben y distribuyen los fotoasimilados a las semillas.

### **3.1.2. Composición de moléculas de reserva en semillas del frijol**

En México, el frijol (*P. vulgaris*) ha sido un grano fundamental en la alimentación de humanos durante siglos; ha sido una de las principales fuentes de proteína (14 a 33%, de faseolina, lectinas y argelinas) en Latinoamérica y África; además, es fuente de vitaminas de complejo B, como ácido fólico y tiamina; también, contiene minerales, como Ca, Cu, Fe, K, Mg, P y Zn y fibra alimentaria (15.5 a 21.0 g por cada 100 g de grano cocinado). El frijol, junto con los cereales, complementa el balance de los aminoácidos

esenciales (Raya-Pérez *et al.*, 2014; Peña-Valdivia *et al.*, 2011; Camacho-Espinoza *et al.*, 2010).

El contenido y concentración de proteínas en las semillas de frijol difieren entre los cultivares, oscila entre 15 % y 35 %. Los aminoácidos proteicos predominantes en los frijoles secos son la lisina (10 a 104 mg g<sup>-1</sup>), leucina (14 a 92 mg g<sup>-1</sup>), fenilalanina y tirosina (53-105 mg g<sup>-1</sup>); al contrario, su contenido de los aminoácidos azufrados: metionina y cisteína (4,0-20 mg g<sup>-1</sup>) es mínimo (Carbas *et al.*, 2020; Rezende *et al.*, 2017; Baptista *et al.*, 2017; Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017; Peña-Valdivia *et al.*, 2011; Guzmán-Maldonado *et al.*, 2000). Las semillas de frijol crudos contienen entre 55 y 75 g de carbohidratos en 100 g; de estos, la fracción predominante es almidón, que constituye casi 50 % del peso de la semilla (Ganesan y Xu, 2017). La fracción lipídica del frijol es aproximadamente 1.5 a 6.5 g en 100 g y está compuesta principalmente por ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (Golam *et al.*, 2011; Mederos, 2006).

### **3.1.3. Papel de la vaina como tejido de reserva**

Las valvas o pericarpios de los frutos de las leguminosas protegen a las semillas durante su desarrollo de la presencia de patógenos y depredadores (Sengupta *et al.*, 2019; Bennett *et al.*, 2011). Las valvas están formadas por celulosa, polímeros de pectina, proteínas (estructurales y enzimas), almidón y monosacáridos (Stolle-Smits *et al.*, 1999). El contenido de proteína puede ser hasta 30 %; además, contiene calcio, fósforo, magnesio, cobre y su proporción de fibra oscila entre 18 y 62 % (Hernández-Morales *et al.*, 2017).

En la mayoría de las leguminosas la pared de las valvas presenta tres capas de células funcionales, denominadas exocarpio, mesocarpio y endocarpio (Bennet *et al.*, 2011). Las valvas en chícharo (*Pisum sativum* L.) incluyen una cutícula gruesa y estomas en la epidermis externa, nervaduras que se proyectan hacia adentro de la red vascular en el mesocarpio, escasez de espacios de aire, capas de fibra, parénquima en el endocarpio y abundantes cloroplastos (Atkins y Pate, 1977).

Reeve y Brown (1968) describieron la estructura de la vaina de *P. vulgaris* en etapa inicial de desarrollo, en botón floral y flor expuesta. La investigación mostró que en botón floral la pared de la vaina está formada de tejido parenquimatoso limitado por una epidermis externa y una interna, dentro de ellas hay una capa de células denominadas hipodermis externa e interna. Cuando la flor se abre, la hipodermis y la epidermis internas originan al parénquima interno que rodea a la cavidad del fruto y la capa interna de fibras esclereidas. Después de la floración, las fibras esclereidas de la capa interna engruesan sus paredes. A lo largo de la sutura y nervadura dorsales existen haces vasculares rodeados de fascículos de fibras esclereidas (Herrera-Flores *et al.*, 2005).

Otra función de las valvas está relacionada con la capacidad fotosintética que realizan (Wang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016); además generan un espacio, entre el pericarpio y la semilla, que permite la refijación de carbono (Furbackr *et al.*, 2004). Los resultados experimentales han mostrado que los fotoasimilados en las valvas favorecen el crecimiento de las semillas (Chopra *et al.*, 2003). Además, la evidencia indica que las valvas podrían transmitir señales químicas que coordinen el llenado de la semilla y regulen la reasignación de los recursos metabólicos destinados a semillas dañadas a aquellas que han conservado la viabilidad (Terán *et al.*, 2019; Bennett *et al.*, 2011).

### **3.1.4. Fotosíntesis en vainas de leguminosas**

Las vainas de las leguminosas presentan fotosíntesis; aunque, es menor que en las hojas. Además, la densidad estomática de la epidermis de la pared de la vaina en las leguminosas es menos de un tercio que en las hojas (Furbank, 2004; Svec y Andrews, 1975). En alfalfa las paredes de las vainas presentan cambios ultraestructurales, fisiológicos y proteómicos durante su desarrollo que permiten sugerir que realizan fotosíntesis, sintetizan ATP y el metabolismo asociado a la resistencia al estrés por sequía que garantiza el funcionamiento de las reacciones fisiológicas (Wang *et al.*, 2020).

En *Brassica* la tasa de fotosíntesis de la vaina y las actividades de las enzimas del ciclo de reducción del carbono fotosintético fueron máximas en las vainas jóvenes; pero, sus niveles son suficientemente altos hasta 40 días después de la antesis. La tasa de fijación de CO<sub>2</sub> en las semillas aumentó hasta 21 días después de la antesis y luego disminuyó (Singal *et al.*, 1995). Asimismo, existe evidencia de que la vaina fija una proporción sustancial del CO<sub>2</sub> liberado en la respiración diurna (Atkins y Pate, 1977).

### **3.1.5. El papel de la vaina en plantas de frijol en respuesta al estrés por baja disponibilidad de agua**

En México, alrededor de 85% de frijol se cultiva en condiciones de secano; en estas condiciones, el rendimiento promedio es 450 kg ha<sup>-1</sup> (Jiménez y Acosta, 2013). Además, debido a que este cultivo se desarrolla con regímenes de precipitación erráticos e intermitentes, la producción puede perderse totalmente en años con sequías prolongadas (SAGARPA, 2017). En México, la sequía excepcional en 2011 redujo 11 %

el rendimiento de frijol y la producción total representó 51.2 % respecto al año anterior (Montero-Tavera *et al.*, 2019).

La sequía impacta sustancialmente el rendimiento de semillas al reducir el tamaño y el número de estructuras reproductivas; lo que, eventualmente afecta el rasgo comercial 'peso de 100 semillas' y la calidad de las semillas (Sehgal *et al.*, 2018). Una proporción de la biomasa del pericarpio es translocada hacia la semilla (Morales-Rosales *et al.*, 2008); el proceso se cuantifica con el índice de cosecha de la vaina (ICV) (Assefa *et al.*, 2013).

Assefa *et al.* (2013) subrayaron la importancia del índice de cosecha de vainas (siglas en inglés, PHI); ya que, este índice podría ser un criterio de selección eficaz para evaluar la resistencia a la sequía. Ya que el PHI se redujo en los cultivares sensibles al déficit de humedad y aumentó en los cultivares resistentes en condiciones de estrés por sequía, la importancia de la removilización de los fotosintatos de la pared de la vaina a la semilla fue evidente.

Entre las moléculas identificadas como moléculas de reserva, que se degradan para usarse están carbohidratos, como sacarosa y almidón (Singal *et al.*, 1993). Cuellar *et al.* (2008) observaron que las vainas en estrés hídrico, del cultivar resistente a la sequía incrementaron el almacén de almidón comparadas con las del cultivar sensible a la sequía; además, la acumulación máxima de almidón sucedió en las vainas y no en las hojas durante el llenado de semillas. Estos resultados coincidieron con los de Coello y Martínez-Barajas (2014) y Padilla-Chacón *et al.* (2017); en estos estudios se demostró que las vainas en condiciones óptimas acumulan almidón abundante y algunos cultivares

pueden acumularlo cuando las plantas están con restricción de humedad. Sin embargo, la utilización eficiente de este almidón depende de la actividad de las enzimas amilolíticas que lo degradan directamente (Müntz, 1977). Estas enzimas y sus funciones se conocen sólo parcialmente.

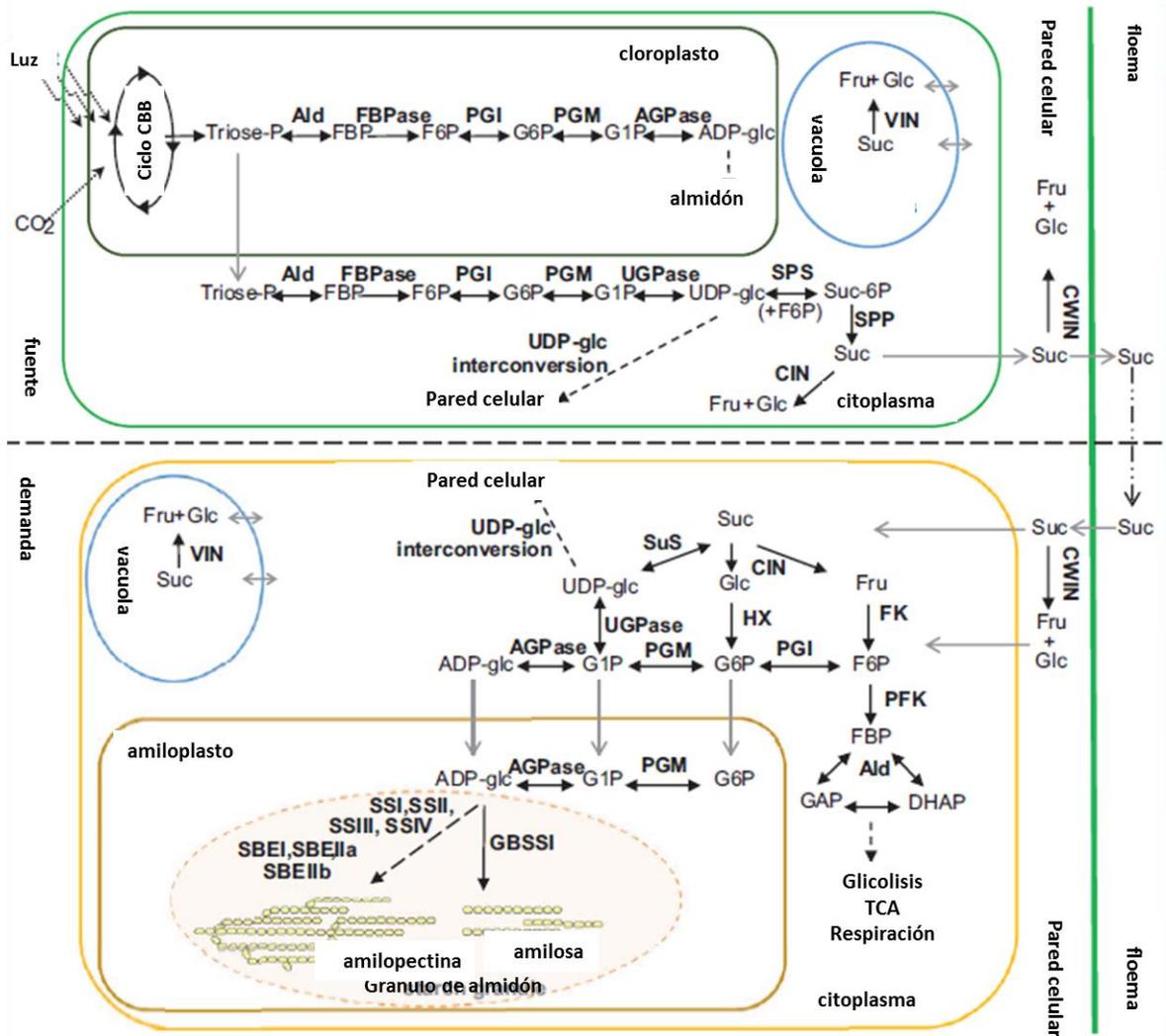
Actualmente, el conocimiento del conjunto de procesos que definen el uso de la sacarosa en las vainas y en semillas es escaso. Este azúcar se descarga desde el floema y en condiciones estándar y de estrés representa la fuente de carbono de las valvas a las semillas, pero se desconocen los eventos bioquímicos que caracterizan su uso en los frutos en racimos, que usualmente difieren en el número de semillas. Por lo que, ante el vacío de este conocimiento, parece necesario explorar el efecto del déficit de humedad en la regulación de la fuerza de demanda en esos frutos.

### **3.2. Metabolismo de sacarosa en tejidos fotosintéticos**

Las hojas fotosintéticas usan energía solar para fijar el CO<sub>2</sub> y producir triosa-fosfato (triosa-P) en el cloroplasto que puede exportarse al citoplasma, en el que se sintetiza sacarosa, o mantenerse dentro del cloroplasto, durante el periodo diurno, con luz, con la síntesis de almidón (Figura 1). La síntesis de sacarosa en el citosol la catalizan dos enzimas: suc-fosfato sintasa (SPS; EC 2.4.1.14) y suc-fosfato fosfatasa (SPP; EC 3.1.3.24). SPS utiliza UDP-glucosa (UDP-glc) y fructosa-6-fosfato (fru-6-fosfato) como sustratos para sintetizar sacarosa-6-fosfato (suc-6-fosfato) y SPP libera ortofosfato (Pi) y de suc-6-fosfato produciendo sacarosa (Ruan, 2014).

La sacarosa puede ser almacenada en la vacuola, hidrolizada por las invertasas (INV), produciendo glucosa y fructosa, o por la sacarosa sintasa (SUS), la que produce

UDP-glucosa y fructosa. Ambas vías suelen degradar la sacarosa *in vivo*, pero los productos difieren entre las vías. Las invertasas que producen glucosa en lugar de UDP-glucosa forman el doble de hexosas (Figura 1).

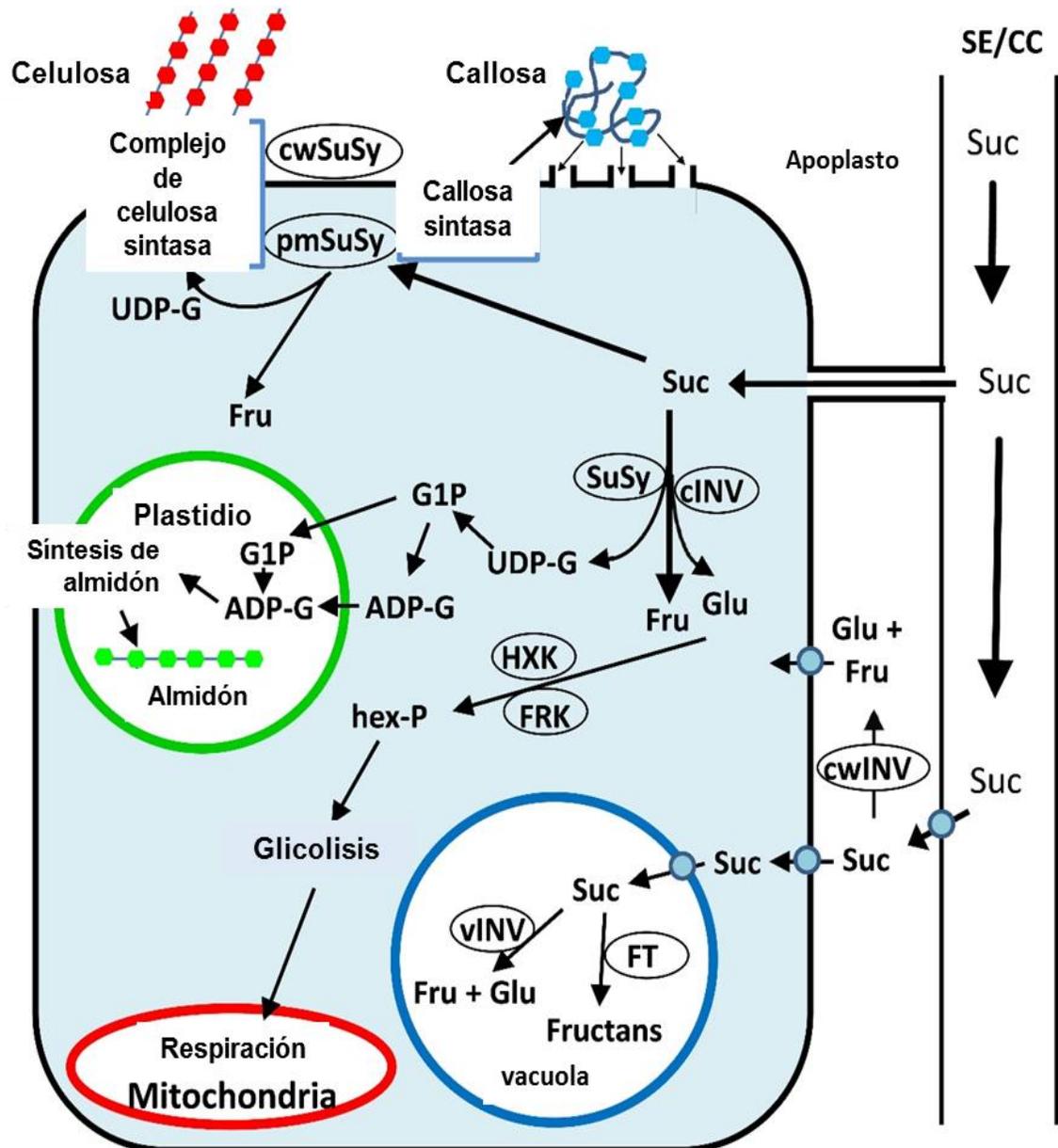


**Figura 1.** Descripción general del metabolismo del carbono en los tejidos fuente (hoja) y demanda (semilla). Los tejidos fuente fotosintéticos, como las hojas bandera de cebada, sintetizan los carbohidratos. Éstos se exportan en forma de sacarosa (Suc), al tejido demanda como el endospermo del cereal. Allí, Suc es sustrato en la biosíntesis de almidón y carbohidratos de pared celular y en la glucólisis. CBB: ciclo Calvin-Benson-Bassham; TCA: ciclo de los ácidos tricarbónicos; ADP-glc, ADP-glucosa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; Ald: fructosa-bisfosfato aldolasa; CWIN: invertasa de pared celular; CIN: invertasa citoplasmática; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; FBP: fructosa-1,6-bisfosfato; FBPasa: fructosa-1,6-bis-fosfatasa; FK: fructoquinasa; Fru: fructosa; F6P: fructosa-6-fosfato; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; GBSS: almidón sintasa unida a gránulos; Glc: glucosa; G1P: glucosa-1-fosfato; G6P: glucosa-6-fosfato; PGI: fosfoglucoisomerasa; PGM: fosfoglucomutasa; PFK: fosfofructoquinasa; SBE: enzima ramificadora del almidón; SPP: sacarosa-fosfato fosfatasa; SPS: sacarosa-fosfato sintasa; SS: almidón sintasa; Suc-6P: sacarosa-6-fosfato; SuS: sacarosa sintasa; UDP-glc: UDP-glucosa; UGPasa: UDP glucosa pirofosforilasa; VIN: invertasa vacuolar (modificado de Cuesta-Seijo *et al.*, 2019).

### 3.2.1. Metabolismo de sacarosa en tejidos no fotosintéticos

En tejidos no fotosintéticos o de demanda, se ha demostrado que el uso de la sacarosa depende del tipo de tejido y etapa de desarrollo (Yoon *et al.*, 2021). Inicialmente, la sacarosa sintetizada en las hojas viaja por el floema y es descargada por vía simplástica o apoplástica (Belmont *et al.*, 2022; Aluko *et al.*, 2021). La vía en que la sacarosa es asimilada, después de la descargada, responde a las necesidades metabólicas de cada tejido y es afectada por el ambiente (Figura 2). En la descarga apoplástica, la sacarosa puede ser asimilada directamente, con la intervención de transportadores, identificados como SUT1, dependientes de energía (Slewinski *et al.*, 2010).

La hidrólisis irreversible de la sacarosa, por las invertasas, forma hexosas, como glucosa y fructosa; la movilización de estos azúcares depende de la actividad, dependiente de energía, de transportadores de hexosas (HXTs) (Geiger, 2020). La coexpresión de invertasa de pared celular (*CWINV*) con transportadores permite la entrada apoplásmica de azúcares que son usados para el crecimiento y desarrollo en los órganos reproductivos (Shen *et al.*, 2019). Adicionalmente, si la sacarosa es incorporada al interior de la célula puede ser degradada por invertasas del citosol (*CINV*) o la vacuola (*VINV*); las funciones de éstas pueden relacionarse con crecimiento y desarrollo de frutos (Roitsch *et al.*, 2003) (Figura 2).



**Figura 2.** Presentación simplificada del metabolismo de azúcares en las células del tejido demanda hacia la síntesis de celulosa, calosa y almidón. Suc puede hidrolizarse a Glc y Fru en el apoplasto por CWINV, e incorporarse a la célula por un transportador de monosacáridos. Alternativamente, Suc puede enviarse a la célula demandante por un transportador Suc o ingresar a través de plasmodesmata. Dentro de la célula, Suc puede almacenarse en la vacuola o hidrolizarse por VINV. En el citosol, Suc puede hidrolizarse por INV citosólica y producir Glc y Fru, o escindirse por SuSy citosólica y producir Fru y UDP-G. Las hexosas pueden fosforilarse a hexosa fosfato (hex-P), dirigirse a la síntesis de almidón en el plástido o a glucólisis y luego a la respiración en la mitocondria o dirigirse a otras vías metabólicas. SuSy asociado a la membrana plasmática (pmSuSy) y cwSUS pueden transportar UDP-G que se utiliza en la síntesis de celulosa para las paredes celulares y calosa para la plasmodesmata (modificado de Stein y Granot, 2019).

### 3.2.2. Invertasas en plantas

Las invertasas son enzimas con actividad  $\beta$ -D-fructofuranosidasas, que catalizan la hidrólisis irreversible de sacarosa en glucosa y fructosa (Qian *et al.*, 2016). Las invertasas desempeñan un papel fundamental en procesos celulares, como el transporte y la partición de carbohidratos en las plantas (Koch, 2004); además, ciertos azúcares participan en la señalización durante el estrés biótico (Lammens *et al.*, 2008) y abiótico, e indirectamente en la diferenciación celular y el desarrollo de las plantas (Sturm, 1999).

Las invertasas con actividad en pH ácido, son enzimas vacuolares o de la pared celular y están relacionadas evolutivamente con las invertasas de levaduras y bacterias (Sturm *et al.*, 2002). De acuerdo con Vargas (2003), las invertasas con actividad en medio alcalino y neutro se originaron a partir de un gen ancestral similar al de la invertasa ácida, hace unos 2 a 3.5 millones de años. Esto respalda el origen propuesto del metabolismo de la sacarosa basado en la aparición de un gen ancestral similar al de la sacarosa fosfato sintasa. Al respecto, la evidencia indica que los cloroplastos de las plantas tienen un origen cianobacteriano y que los genes podrían transferirse del cloroplasto al genoma nuclear (Cumino *et al.*, 2002).

Mediante análisis bioquímicos y moleculares en plantas se han identificado isoformas de invertasas que se clasifican según su localización sub-celular: a) solubles, presentes en vacuola o citosol, también en plástidos y mitocondrias, o b) insolubles, unidas con enlaces glucosilados a la pared celular (Sherson *et al.*, 2003). En general, su papel en el metabolismo es esencial dado que regulan el balance de carbono en la planta.

### **3.2.2.1. Invertasas solubles**

Las invertasas solubles pueden ser ácidas o alcalinas/neutras. Las primeras son caracterizadas por su actividad en pH óptimo de 5.0 a 5.5. Las invertasas ácidas no son glucosiladas y se ubican principalmente en las vacuolas de las células del parénquima de almacenaje (Welham *et al.*, 2009) y en tejidos de crecimiento rápido, como los cultivos *in vitro*, ápices de raíz y entrenudos inmaduros (Sturn, 1999). También se ha reportado que la actividad de las invertasas ácidas se inhibe por un polipéptido de 17 kD de manera dependiente de pH (Weil *et al.*, 1994).

El segundo tipo de invertasas solubles, el de las alcalinas/neutras, también son conocidas como alcalinas o citoplasmáticas muestran pH-óptimo de pH 6.8 a 8.0. Actualmente, la información sobre sus funciones fisiológicas es limitada, en parte, por su actividad baja y se han clonado y caracterizado sus secuencias escasamente (Rende *et al.*, 2017).

### **3.2.2.2. Invertasas insolubles**

Las invertasas de pared celular, o insolubles CWINV, son conocidas como invertasas extracelulares ya que están unidas a la pared celular, por un enlace N-glucosídico. Las CWINV se caracterizan por el pH óptimo bajo (de pH 3.5 a 5.0) para su actividad y con punto isoeléctrico alto (Ji *et al.*, 2005). La función de las CWINV es regular la proporción sacarosa en el apoplasto de tejidos de demanda (Liao, 2020).

Las CWINV son parte central del mecanismo que coordina la comunicación entre los productos de la fotosíntesis y la fuerza de demanda, de tejidos de demanda, en respuesta a la concentración de azúcares y estímulos por estrés biótico y abiótico

(Sherson et al., 2003). Las CWINV es el tipo que se ha estudiado más, debido a que su actividad es alta en comparación con la de VINV y CINV y porque impacta en la composición y fisiología de plantas. Estudios bioquímicos y moleculares indican que CWINV controla el flujo de carbono en tejidos reproductivos, como en el óvulo de *Arabidopsis thaliana* durante su desarrollo (Liao et al., 2020), la formación de estilos y ovarios en flores, de tomate (*Solanum lycopersicum*), en desarrollo (Shen et al., 2019) y formación del polen en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Además, recientemente se demostró que CWINV participa en la acumulación de néctar en *Brassica* spp, (Minami et al., 2021).

En maíz (*Zea mays*) las invertasas ácidas regulan las divisiones celulares del endospermo y el embrión, especialmente durante el desarrollo temprano de la semilla (Chen et al., 2019). En el contexto del desarrollo de estructuras reproductivas, es de vital importancia mantener las flores, especialmente si el ambiente es adverso para las plantas, el flujo de carbono se interrumpe y se compromete el proceso de polinización (Salter y Goode, 1967), lo que, a la vez, provoca el aborto de flores por la esterilidad del polen o bloqueo del desarrollo del ovario (McLaughlin y Boyer, 2004).

### **3.2.3. Respuesta de las invertasas al estrés abiótico**

Estudios funcionales acerca del papel de las invertasas en condiciones de estrés por déficit de humedad, indican que las CWINV actúan en la regulación de fenotipos complejos, como la calidad de los cultivos y su rendimiento. Evidencias experimentales mostraron que la actividad de CWINV-VINV está coordinada a la de transportadores de hexosas (Sherson et al., 2003) y responden al estrés relacionado con ABA (Wang et al.,

2017). Además, la actividad de invertasa está relacionadas con la pérdida de la función de estructuras reproductivas en cultivos en estrés abiótico.

En plantas de trigo en sequía, la esterilidad masculina durante la meiosis se relaciona con la disminución de la actividad de VINV (Shokat *et al.*, 2020). Este efecto se acompañó con la disminución en la descarga del floema en el tejido maternal. La evidencia en maíz indica que algunos genes, involucrados en el desarrollo del ovario, responden a la deficiencia de agua y a los niveles de azúcares (McLaughlin y Boyer, 2004). El aumento de la actividad de CWINV y las concentraciones de hexosa cuantificados en las hojas de las plantas CIN1, con regímenes normales de riego, podría disminuir la conductancia estomática durante la sequía. La invertasa extracelular LIN6 participa en la partición de asimilados en tomate (*Solanum lycopersicum*), en la regulación de las relaciones fuente-demanda, en los procesos de desarrollo y en el suministro de carbohidratos al gametofito masculino (Roitsch *et al.*, 1995).

Los genes de invertasa y los genes relacionados con la protección contra patógenos son disminuidos por azúcares solubles; por lo que, la abundancia de carbohidratos podría servir como energía metabólica para apoyar las respuestas de protección adecuadas y como una señal de autoamplificación, que resulta en una retención intensificada de carbohidratos y modulación de la expresión génica (Proels y Roitsch, 2009). La actividad de invertasa vacuolar durante la primera etapa de la infección de ricino (*Ricinus communis*) por *Agrobacterium tumefaciens*, indica una función de apoyo durante la invasión, la regulación positiva de la actividad de CWINV es esencial para modular la partición de azúcar y proporcionar los azúcares que son necesarios para el desarrollo del patógeno; lo anterior se ha descrito en *A. thaliana*

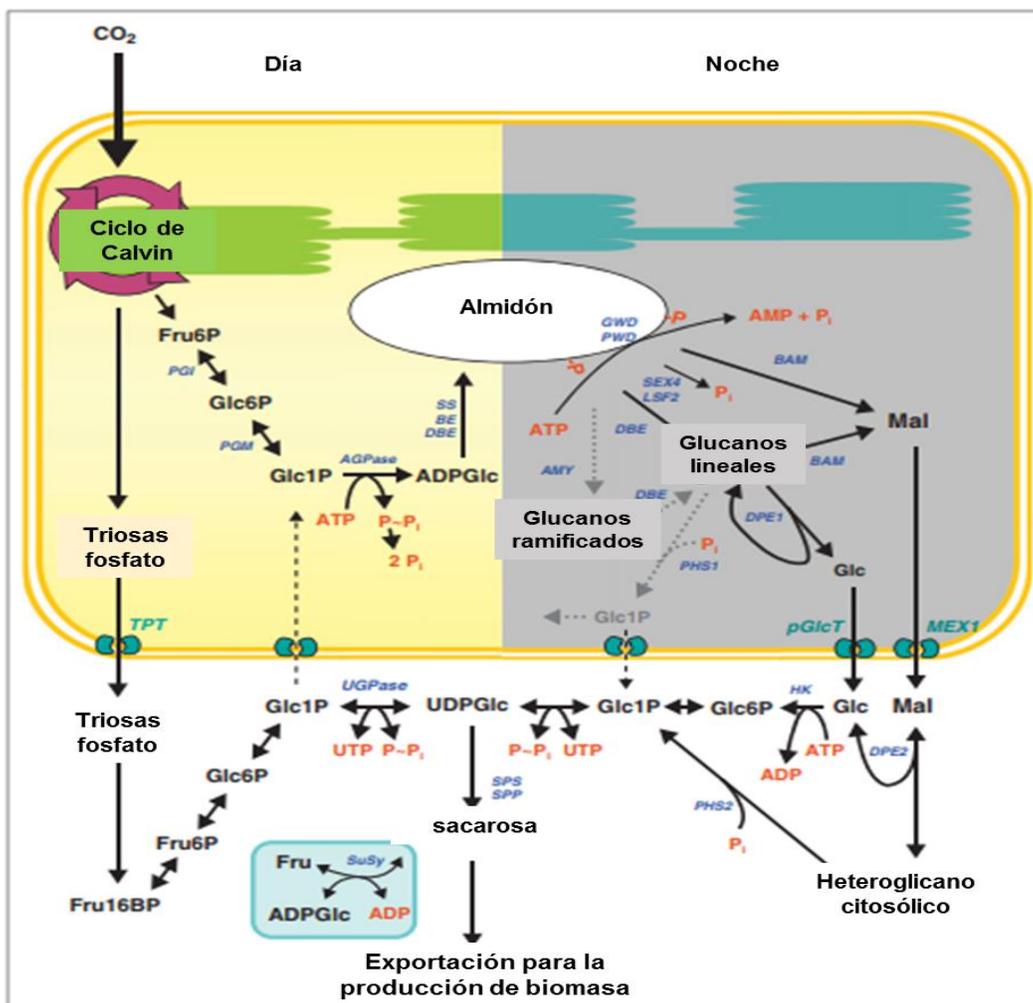
(Siemens *et al.*, 2011). La actividad de CWINV también se desencadena durante una infección, en respuesta a la invasión del patógeno a la planta, a la inducción de la expresión génica relacionada con la infección, al depósito de calosa y la reducción de la fotosíntesis o la muerte celular (Tauzin y Giardina, 2014).

#### **3.2.4. Metabolismo de almidón en tejidos fotosintéticos**

El almidón es un producto de la fotosíntesis en las hojas. En la mayoría de las plantas, una gran fracción del carbono asimilado durante el día se almacena transitoriamente en el cloroplasto como almidón para su uso durante la noche (Zeeman *et al.*, 2007) (Figura 3). El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Smith y Zeeman, 2020), la amilosa es un polímero lineal compuesto de cadenas de glucano, con enlaces  $\alpha$ -1,4, con pocas ramas conectadas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6. La amilopectina es más grande que la molécula de amilosa y contiene abundantes ramas  $\alpha$ -1,6 que conectan las cadenas de glucano con enlaces  $\alpha$ -1,4 y forman un marco estructural de laminillas amorfas y cristalinas repetidas (Qu *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2017).

La ruta de biosíntesis del almidón involucra gran número de enzimas e isoenzimas que interactúan en complejos multiproteínicos (Tofiño *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2005). Algunas de las enzimas son ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa, EC: 2.7.7.27), almidón sintasa (SS, EC: 2.4.1.21), almidón sintasa unido a gránulos (GBSS, EC: 2.4.1.242), enzima ramificadora de almidón (SBE, EC: 2.4.1.18), enzima desramificante de almidón (DBE, EC: 3.2.1.196),  $\alpha$ -amilasa (AMY, EC: 3.2.1.1),  $\beta$ -

amilasa (BAM, EC: 3.2.1.2), entre otras enzimas y factores (López-González *et al.*, 2019) (Figura 3).



**Figura 3.** Vías de síntesis y degradación del almidón en hojas de *Arabidopsis*. Los sustratos para la síntesis de almidón derivan predominantemente de la actividad del cloroplasto, directamente del ciclo de Calvin-Benson. También, puede importarse algo de Glc1P del citosol. La sacarosa sintasa (SuSy) puede generar ADPGlc en el citosol (resaltado en azul), pero no se conoce algún transportador. Por la noche, la superficie del gránulo de almidón se altera por la fosforilación, seguida de la desfosforilación simultánea y la hidrólisis de glucano. Los principales productos exportados son los azúcares neutros maltosa (Mal) y glucosa (Glc). Algo de Glc1P puede generarse a través de la fosforólisis y podría exportarse. En el citosol, la maltosa se metaboliza a través de una reacción de transglucosilación a un heteroglucano intermedio citosólico. PGM: fosfoglucomutasa; PGI: fosfoglucosa isomerasa; AGPase: ADPglucosa pirofosforilasa; SS: almidón sintasa; BE: enzima ramificadora; DBE: enzima desramificadora; TPT: translocador de triosa-fosfato/fosfato; UGPase: UDPglucosa pirofosforilasa; SPS: sacarosa-fosfato sintasa; SPP: sacarosa fosfato fosfatasa; GWD: glucano, agua diquinasa; PWD: fosfoglucano, agua diquinasa; SEX4 y LSF2: fosfoglucano fosfatasas; AMY:  $\alpha$ -amilasa; BAM:  $\beta$ -amilasa; DPE: enzima desproporcionadora; PHS:  $\alpha$ -glucano fosforilasa; pGlcT: transportador de glucosa; MEX1: transportador de maltosa; HK: hexoquinasa (modificado de Stitt y Zeeman, 2012).

El almidón en las hojas se almacena durante el día y se degrada en la noche, por lo que la luz es un factor determinante en la activación y regulación del metabolismo del almidón; por lo que, las modificaciones drásticas en el ritmo circadiano como la intensidad y calidad de la luz, afectan la tasa de acumulación y degradación del almidón y la removilización de los productos hidrolíticos del almidón y la concentración de carbohidratos solubles (Tofiño *et al.*, 2007) (Figura 3).

La degradación del almidón depende de la estructura del gránulo, de la participación de diversas enzimas y de su asociación con el gránulo. En todos los casos la síntesis y degradación del almidón se llevan a cabo en los plastidios, pero ambos procesos en cada órgano, pueden regularse de manera diferente: mientras que el endospermo, al momento de la germinación, puede asemejarse a una bolsa repleta de almidón que recibe a las enzimas hidrolíticas, en las células de las hojas el almidón se degrada y provee el carbono para el mantenimiento de procesos celulares (Bernal y Martínez-Barajas, 2006).

La característica principal del almidón de reserva, que lo diferencia del almidón transitorio sintetizado en los cloroplastos de células fotosintéticas, es que la síntesis y degradación ocurren en fases distintas del ciclo de vida de la semilla como el desarrollo y la germinación. En contraste, la síntesis y degradación del almidón transitorio ocurren alternadamente y dinámicamente durante el ciclo día/noche (Zeeman *et al.*, 2007). En tejidos no fotosintéticos, como las semillas de cereales, acumulan grandes cantidades de almidón, la fuente de carbono para la síntesis del almidón procede de la sacarosa sintetizada en el tejido fuente e importada a los órganos demanda a través del sistema

vascular de la planta que constituye una reserva energética primordial para la germinación (Pfister y Zeeman , 2016).

### **3.2.5. Azúcares en la señalización y estrés**

Los azúcares tienen funciones diversas en la vida de las plantas: son sustancias estructurales y de almacenamiento, sustratos respiratorios y metabolitos intermedios de muchos procesos bioquímicos, también pueden desempeñar un papel importante en las reacciones de protección de las plantas (Ciereszko, 2018). Los azúcares interactúan con hormonas, a lo que se conoce por su nombre en inglés como "crosstalk". En esa interacción la señalización entre los azúcares y las auxinas tienen un papel sobresaliente en la liberación y el crecimiento de las yemas axilares, que están relacionadas directamente con el grado de ramificación del brote y, por lo tanto, con el rendimiento del cultivo (Bhuwaneshwar *et al.*, 2021).

Así, la sacarosa es un potente regulador de la morfología y el desarrollo de estructuras reproductivas debido a que participa en la expansión (Borisjuk *et al.*, 2004), señalización (Ruan, 2014) e interacción con fitohormonas (Eveland y Jackson, 2012). Similarmente, la glucosa y la trehalosa-6-fosfato (Tre6P) pueden regular una serie de procesos metabólicos y del crecimiento, independientes de las funciones basales; también pueden actuar como moléculas de señalización (Ciereszko, 2018).

La sacarosa puede pasar del floema al citoplasma de las células demandantes, vía simplástica o apoplástica. Esta es una distinción relevante porque los sitios de la interfaz de la membrana se han implicado en mecanismos específicos de detección de sacarosa y hexosas. Esta es evidencia de regulación cruzada o "crosstalk" en la

integración entre señales que responden a fitohormonas, fosfato, luz y azúcares. La compartimentación subcelular y la ruta de hidrólisis de la sacarosa son relevantes para el desarrollo, crecimiento y rendimiento de semilla (Tiessen y Padilla-Chacón, 2012).

La señalización por azúcares desempeña un papel en la regulación de la senescencia en una red compleja. El metabolismo de los azúcares también juega un papel trascendental en la respuesta al progreso de la abscisión de los frutos; se demostró que los contenidos de sorbitol, glucosa, fructosa y sacarosa son menores en los frutos en abscisión que en los frutos persistentes (Zhang *et al.*, 2021). Otra función de los azúcares en la señalización es su participación en la regulación de la división y expansión celular (Ruan, 2014); además, la sacarosa promueve la endorreproducción celular y acumulación de almidón (Wang y Ruan, 2013).

La sacarosa es un metabolito clave que participa en la señalización celular y el estado de los nutrientes; además, tiene funciones como osmolito, en respuesta al estrés abiótico. La concentración de los azúcares solubles, particularmente de sacarosa, se alteran notablemente en los compartimentos subcelulares (Kaur *et al.*, 2021).

La trehalosa, un disacárido no reductor con funciones celulares múltiples, *e.g.*, fuente de energía y carbono, protector del estrés y molécula señalizadora; se ha estudiado principalmente su papel en el desarrollo de las plantas y la respuesta al estrés, con relevancia en el estrés por déficit de humedad (Macovei *et al.*, 2019). La trehalosa-6-fosfato, induce una reacción rápida al estrés nutricional durante la inducción temprana de la abscisión (Goetz *et al.*, 2021).

El estrés abiótico específicamente, la lesión mediada por el estrés por sequía resulta en la reprogramación de la distribución de azúcar en los compartimentos celulares y subcelulares. Durante el estrés, la homeostasis del azúcar entre "fuente y demanda" se facilita por su distribución espacial y su señal que opera localmente y a distancia (Kaur *et al.*, 2021).

### **3.2.6. Genoma del frijol y la base de datos Phytozome**

Arumuganathan y Earle (1991) indicaron que el tamaño del genoma del frijol (*P. vulgaris*) es relativamente pequeño, con tamaño estimado de 637 Mb. Actualmente, el genoma del frijol andino *P. vulgaris* G19883 se documentó, en genoma ensamblado, con 473 Mb y cerca de 27197 genes y en el caso de la línea Mesoamericana BAT93 la estimación es de 549.6 Mb y 28520 genes (Vlasova, 2016).

La plataforma Phytozome es el portal de Genómica Comparativa de Plantas del Instituto Conjunto del Genoma (JGI), del Departamento de Energía, EE.UU.; esta plataforma brinda a sus usuarios y a la comunidad científica que estudia a las plantas, información para acceder, visualizar y analizar genomas secuenciados de plantas en el JGI y conjuntos de datos y genomas seleccionados que han sido secuenciados en otras instituciones. Esa gran colección de genomas de plantas, en un único recurso que permite realizar anotaciones y análisis integrales y uniformes, Phytozome facilita estudios de genómica comparativa precisos y perspicaces (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

Al respecto, todos los conjuntos de genes en Phytozome han sido anotados con KOG, KEGG, ENZYME, Pathway y la familia InterPro de herramientas de análisis de proteínas. Los grupos de ortología y paralogía por pares inparanoides se han calculado

en todos los proteomas de Phytozome. Las herramientas de búsqueda y visualización permiten a los usuarios encontrar y analizar rápidamente genes o regiones genómicas de interés. Las instancias PhytoMine y BioMart de Phytozome proporcionan acceso a datos basados en consultas; además puede accederse a conjuntos de datos masivos a través del Genome Portal de JGI (<https://www.genome.gov/>). Los navegadores de genoma JBrowse están disponibles para todos los genomas (Goodstein et al., 2022).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

El estudio se realizó con el cultivar OTI de *P. vulgaris*. Las semillas fueron donadas por el Programa de Semillas del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados. Este cv., con hábito de crecimiento tipo I (determinado) y ciclo de 110 a 130 días, es susceptible a sequías; se seleccionó para el cultivo en los Valles Altos Centrales de México y su rendimiento es de 2.75 toneladas  $ha^{-1}$  (Estrada *et al.*, 2004).

### 4.2. Diseño experimental

El estudio se realizó en invernadero tipo túnel, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 27'40" N, 98° 54' 19" O y altitud aproximada de 2253 m), de abril a octubre de 2020. La temperatura promedio mínima y máxima fue 7.5 °C y 40.2 °C. Las plantas se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar de dos tratamientos (riego, 100% de capacidad de campo, CC y restricción de humedad, 50% CC) con diez repeticiones por tratamiento y una planta por maceta como unidad experimental. Las plantas se cultivaron en macetas de plástico con 4 kg de suelo agrícola (migajón limoso), con capacidad de campo (CC) de 37 % y punto de marchitez permanente (PMP) de 19 % (Cuadro 1). Las cuales se mantuvieron en riego con solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961).

Una vez que las plantas alcanzaron la etapa R8, o llenado de semillas, se formaron dos grupos. Uno se mantuvo con niveles de humedad equivalente a 100 % CC, al otro se le redujo el riego, en cantidades que mantuvieron el suelo con 50 % de CC

durante 10 días. La pérdida de humedad en el sustrato se determinó por gravimetría diariamente, a las 8:30 am y a cada maceta se adicionó la cantidad de agua necesaria para mantener el nivel de humedad respectiva de cada tratamiento. Los muestreos diurnos-nocturnos se realizaron 10 días después de formar los grupos de plantas con los dos tratamientos e incluyeron cosecha al atardecer (6:00 p. m.), medianoche (12:00 a. m.), amanecer (6:00 a. m.) y mediodía (12:00 p. m.) (Figura 4).

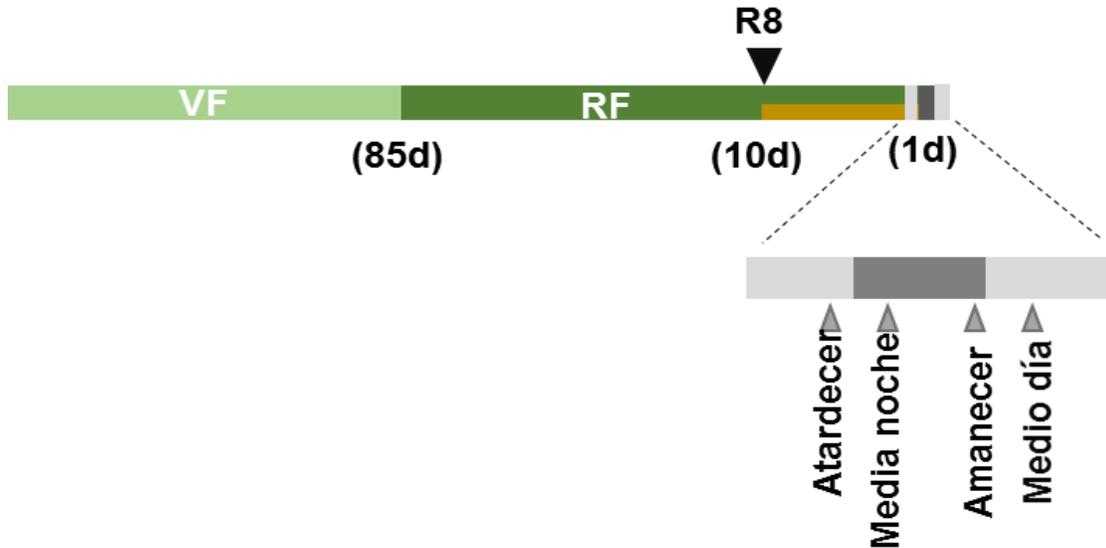
**Cuadro 1.** *Características físicas y químicas del suelo agrícola de la región de Texcoco. Estado de México*

TEXTURA				CC	PMP
Arenas	Limos	Arcilla	Clasificación textural	Humedad	Humedad
(%)	(%)	(%)		(%)	(%)
23	52	25	<b>MIGAJON LIMOSO</b>	37	19

Análisis realizado en el Laboratorio de Física de Suelos del Posgrado en Edafología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos. Métodos: Textura: Bouyoucos.

#### **4.3. Etiquetado de flores**

El total de las flores de cada planta se marcó individualmente, desde R6 hasta el final del periodo de floración e inicio de llenado de semilla o R8 (CIAT, 1985). Con la finalidad de identificar las flores que originarían vainas, se registró la fecha de antesis y se dio seguimiento a las flores que formaron frutos en racimos, con 26 a 29 DDA.



**Figura 4.** Representación de los estados fenológicos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), ajustada al cv. OTI. VF: estado vegetativo; R: estado reproductivo. Dos grupos de plantas en R8, con riego suficiente para mantenerlos con 100 % de capacidad de campo (CC) o 50 % CC durante 10 días. Las vainas en racimos se muestrearon al atardecer (6:00 p.m.), medianoche (12:00 a.m.), amanecer (6:00 a.m.) y mediodía (12:00 p.m.).

#### 4.4. Fenotipaje en imágenes RGB

Antes de cosechar las vainas para evaluarlas, el análisis de fenotipaje se realizó, con la plataforma semiautomática Scanalyzer PL (LemnaTec GmbH®, Aachen, Alemania), en las plantas, con ambos niveles de humedad. Para ello, cada planta se fotografió frontalmente en el espectro visible en rojo, verde y azul (RGB) (400-700 nm) con la cámara digital (Baster AG®, Ahresburg Alemania, (1628 × 1236 píxeles)). Los resultados se obtuvieron a partir de 40 imágenes, mediante el Software LemnaGrid; así, se determinó el porcentaje de senescencia foliar, calificada a partir de la segmentación de color con clasificación: saludable (verde), senescente (amarillo) y necrótico (marrón) (Padilla-Chacón, 2019; Neumann *et al.*, 2015; Rajendran *et al.*, 2009).

#### **4.5. Anatomía del pericarpio**

Fragmentos de pericarpios, de aproximadamente medio centímetro, se fijaron, individualmente, en solución Formol: ácido acético: etanol (FAA, 50:5:10) durante 4 días. Después se mantuvieron en agua por 24 horas y en etilendiamina por otras 24 horas. En seguida, los tejidos se deshidrataron en un gradiente de concentración de alcohol etílico (30%, 50% y 70%), después de 16 horas, 12 horas y 48 horas, respectivamente. Después de esta deshidratación, se realizó otra en alcohol butílico al 10 % y al 100 %, en un cambiador automático Leica® (TP1020), por 24 horas. Al final se hicieron dos inmersiones en Paraplast® (55-60 °C), al 100 %. Las fracciones de tejido en parafina, orientados para un corte transversal, solidificaron a temperatura ambiente en soportes de madera. Los cortes de los tejidos en los bloques de parafina se hicieron con micrótopo rotatorio Leica® (RM2125RT), de cada muestra se obtuvieron ocho cortes, de 12 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos. Los cortes se desparafinaron, se tiñeron con la mezcla de safranina-verde rápido y se incluyeron en resina sintética (Ruzin, 1999) Los cortes se observaron con un microscopio Olympus BX51.

#### **4.6. Producción de biomasa**

Durante los muestreos se contabilizaron las vainas con edad de 26 a 29 DDA, con una o más semillas desarrollada. Los racimos cosechados se introdujeron en bolsas de papel y se deshidrataron en una estufa con circulación forzada de aire (Blue M, EUA®), por 72 h a 80 °C; después, se contabilizaron y pesaron las semillas del total de vainas cosechadas.

#### **4.7. Concentración de azúcares solubles y almidón**

La concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón se cuantificó, con el método descrito por Bernal *et al.*, (2006), en los pericarpios. Cincuenta mg de materia seca triturada se colocaron en tubos tipo eppendorf, de 1.5 mL, se resuspendieron en 500  $\mu$ L de etanol 80 % en agua (v:v), se mantuvieron a 80 °C por una hora y se centrifugaron a 13,000 g. El sobrenadante se recuperó y la pastilla se mantuvo en refrigeración para evaluar almidón.

##### **4.7.1. Azúcares solubles**

Cinco  $\mu$ L del sobrenadante del extracto etanólico se mezclaron con 200  $\mu$ L de la mezcla; HEPES (pH 8.0), KCl 50 mM, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NAD<sup>+</sup> 0.3 mM y 1U de hexokinasa (EC 2.7.1.1.). Las muestras se colocaron en micromicroplacas de 96 pocitos para la primera lectura de la absorbancia a 340 nm (absorbancia basal), con el lector de microplaca (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific®). Después se agregó 1U de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) por extracto, se mantuvo a 35 °C por 40 min y se obtuvo la segunda lectura de la absorbancia a 340 nm en el Multiskan. Después se adicionó 1U de fosfoglucoasa isomerasa (EC 5.3.1.9) a cada muestra, la placa con las muestras se mantuvo a 35 °C por 40 min y se obtuvo la tercera lectura en el Multiskan. Enseguida se adicionó 1U de invertasa (EC 3.2.1.26) a cada muestra, permanecieron a 35 °C por 40 min y se obtuvo la cuarta absorbancia. Las concentraciones de los azúcares se calcularon con la ecuación del ajuste lineal de las curvas obtenidas con soluciones de glucosa 5 mM, fructosa 5 mM y sacarosa 5 mM. En esta secuencia de reacciones, los azúcares están estequiometricamente transformados

a glucosa 6-fosfato (G6PH) y después a 6-fosfogluconato, por cada mol de hexosa transformada a 6-fosfogluconato se produce 1 mol de NADH. Para el cálculo de sacarosa se considera que dos moles de NADH son producidos por cada mol de azúcar (Bernal *et al.*, 2006).

#### **4.7.2. Almidón**

A las pastillas, residuo de la extracción de azúcares, se les agregó 1 mL de dimetil sulfóxido, se agitaron en vortex y se mantuvieron en ebullición por 30 min. Un duplicado de 100  $\mu$ L se separó de cada muestra, a una de esas dos muestras se le añadieron 450  $\mu$ L del amortiguador de acetato de sodio 100 mM (pH 4.5), a la otra se le añadieron 450  $\mu$ L de la mezcla: amortiguador de acetato de sodio 100 mM (pH 4.5), 1U  $\alpha$ -amilasa (Sigma Aldrich®), 10U  $\beta$ -glucosidasa (Sigma-Aldrich®) (Silva *et al.*, 2017). Las muestras se mantuvieron una noche a 55 °C. Después las muestras se centrifugaron a 7,000 *g* por 10 min. Diez  $\mu$ L del sobrenadante se colocaron en pocitos de una microplaca (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific®) con 200  $\mu$ L de la mezcla de reacción descrita antes y 1U de hexoquinasa, se obtuvo la primera lectura de absorbancia a 340 nm en el Multiskan FC microplate photometer (Thermo Scientific®) y después se agregó 1U de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la mezcla se mantuvo a 35 °C por 35 min y se obtuvo la segunda lectura de la absorbancia. Con estos valores se calculó la cantidad de glucosa que corresponde a la degradación del almidón de las muestras. En este caso un mol de hexosa transformada a 6-fosfogluconato produce 1 mol de NADPH (Boehlein *et al.*, 2018).

#### 4.8. Actividad de invertasas solubles e insolubles

La actividad de invertasa se midió en los pericarpios de las vainas en racimo, con frutos largos y cortos, cosechados en el ciclo diurno-nocturno de ambos tratamientos. El tejido deshidratado (72 h a 80 °C), se trituro en mortero. Cincuenta mg de cada muestra se colocaron en tubos eppendorf, de 1.5 mL, se resuspendieron en 1000 µL de amortiguador de extracción (HEPES KOH pH 8.0-50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM), se agitó vigorosamente en vortex, se mantuvo a 37 °C por 30 min, se centrifugó a 8,000 g y se separó el sobrenadante; en él se cuantificó la actividad enzimática de las invertasas solubles CINV y VINV y en la fracción sólida se cuantificó la actividad de invertasa insoluble CWINV.

La actividad de invertasa vacuolar se cuantificó en 50 µL del sobrenadante, 100 µL de amortiguador de reacción de invertasa vacuolar (Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 0.2 M y ácido cítrico 0.1 M, pH 5.5) y 100 µL de sacarosa 0.5 M. Simultáneamente, la actividad de la Invertasa citosólica se cuantificó en 50 µL del sobrenadante mezclado con 100 µL de amortiguador de reacción de invertasa citosólica (Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 0.2 M y ácido cítrico 0.1 M, pH 7.0) y 100 µL de sacarosa 0.5 M. Las muestras se mantuvieron 30 min a 37 °C, la reacción se detuvo con calentamiento de las muestras a 95 °C por 10 min.

El residuo insoluble (pastilla) se utilizó para medir la actividad de Invertasa insoluble CWINV. La pastilla se lavó dos veces con 500 µL de amortiguador de extracción, los sobrenadantes se eliminaron y al residuo se agregaron 500 µL de amortiguador de reacción de invertasa de pared celular (Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 0.2 M y ácido cítrico 0.1 M, pH 5.0), se agitó vigorosamente en vortex, se mantuvo 30 min a 37 °C y se

centrifugó a 13,000 g por 20 min. A 50 µL del sobrenadante se agregaron 100 µL de amortiguador de reacción de CWINV, del sobrenadante y 100 µL de 0.5 M sacarosa. Las muestras se mantuvieron a 37 °C por 30 min y posteriormente la reacción se detuvo con calor (95 °C) por 10 min (Vargas-Ortiz *et al.*, 2013).

El grupo testigo (blancos) de actividad de las invertasas (CINV, VINV y CWINV) se obtuvo de los extractos calentados a 95 °C por 10 min y sustitución de la solución de sacarosa por agua. La actividad enzimática se determinó con el protocolo experimental descrito antes, para cuantificar azúcares solubles (apartado 5.7.1), cuantificando la glucosa producto de la degradación de sacarosa, por minuto, por mg de tejido seco de acuerdo a Bernal *et al.* (2006).

#### **4.9. Identificación de secuencias de invertasas de pared celular**

La secuencia de las invertasas CWINV se identificó de secuencias de invertasas CWINV incluidas en el genoma de frijol (*P. vulgaris*) del sitio de secuencias Phytozome v13.1 ([https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris\\_v2\\_1](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris_v2_1)) (Goodstein *et al.*, 2012) y la información bibliográfica, de IDs, de genes de invertasas reportados actualmente (10/03/2022). La búsqueda de secuencias se realizó en las proteínas, con umbral del 78 % de similitud, con invertasas de pared celular, pertenecientes a familias de genes de especies de *Zea mays* L. (8 IDs, Juárez-Colunga *et al.*, 2018), *Oryza sativa* L. (9 IDs, Zhang *et al.*, 2021), *Brachypodium distachyon* (8 IDs, Li *et al.*, 2012), *Arabidopsis thaliana* L. (6 IDs, Qi , *et al.*, 2007), *Carica papaya* (2 IDs, Zhou y Paull, 2001) y *Populus trichocarpa* (5 IDs, Chen *et al.*, 2015) (Cuadro 2) y de acuerdo con los porcentajes de

similitud se seleccionaron las familias de genes de *Arabidopsis thaliana* y *Populus trichocarpa* (Cuadro 3).

#### 4.10. Diseño de oligonucleótidos

La plataforma IDT integrated DNA technologies (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) se utilizó para seleccionar los oligonucleótidos que amplificarían los genes seleccionados. Las secuencias de las isoformas seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos obtenidas en la plataforma de Phytozome v13 se pegaron en el apartado PrimerQuest Tool. Las principales características de los oligonucleótidos fueron: tamaño del oligonucleótido, 18 a 23 b, porcentaje de G y C, entre 40 y 60 %, diferencia entre temperaturas de los oligonucleótidos menor a 2 °C, la temperatura de los oligonucleótidos, entre 60 y 65 °C y el tamaño del amplicon, entre 80 y 150.

La plataforma de NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se utilizó para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos. Las secuencias de los oligonucleótidos identificadas (Cuadro 4) se sintetizaron en T4OLIGO (<https://t4oligo.com/oligohome/>).

#### 4.11. Análisis bioinformático y filogenético

El análisis filogenético se realizó con las secuencias de aminoácidos de los genes CWINV del frijol y con secuencias identificadas con la base de datos NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pertenecientes a 13 secuencias de dicotiledóneas, 25 de monocotiledóneas y una secuencia de bacteria (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168; descripción tomada de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/938745>) como grupo externo.

Para obtener características de las secuencias de proteínas identificadas, las secuencias de aminoácidos fueron analizadas con el programa PlantCAZyme (<https://bcb.unl.edu/plantcazyme/family.php?species=phvu>). Esto permitió identificar en bases de datos basadas en dbCAN (base de datos para la anotación automatizada de enzimas activas de carbohidratos), secuencias precalculadas, datos de anotación de enzimas activas de carbohidratos (CAZymes, <http://www.cazy.org/Home.html>) (Ekstrom *et al.*, 2014), el peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) con el programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) (Cuadro 5).

Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal X (<http://www.clustal.org/>), versión 1.83, empleando los parámetros por “default” y ajuste por inspección visual. La reconstrucción filogenética de las secuencias de aminoácidos de CWINV se llevó a cabo mediante máxima verosimilitud (ML), con MEGA X con 1000 réplicas de arranque. El modelo de evolución fue seleccionado bajo el criterio de Akaike, con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

#### **4.12. Extracción de RNA**

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo disociador TriZol® (Invitrogen) con base en el método de Chomczynski y Sacchi (1987) más algunas modificaciones que consistieron en agregar polivinilpirrolidona 40 (PVP40) y realizar una serie de purificaciones y lavados. Brevemente, 50 mg de vainas se pulverizaron con nitrógeno líquido más cinco mg de PVP40. Enseguida, el tejido se transfirió a un microtubo tipo Eppendorf de 2 mL al cual se agregaron 1.5 mL de TriZol, se mezcló por inversión y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente (TA). El lisado se pre-purificó con

150 uL de cloroformo, se mezcló por inversión y se dejó incubar por 3 min a TA. Enseguida se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C para formar las tres fases y recuperar el sobrenadante en otro tubo de 2.0 mL, purificarlo con 1 mL de fenol, mezclarlo por inversión y luego centrifugarlo a 12,000 g por 15 min a 4 °C. El nuevo sobrenadante se recuperó ahora en un tubo de 1.5 mL y se purificó nuevamente con 150 uL de cloroformo para volver a centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4 °C.

El ARN se precipitó con isopropanol y una purificación final se hizo con 1 mL de fenol. Se mezcló por inversión, se centrifugó a 10,000 g por 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL. El ARN se volvió a precipitar con 1 mL de cloruro de litio 8 M, se mezcló con vortex y enseguida se centrifugó a 10,000 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces, la primera con cloruro de litio 2 M y los dos restantes con etanol 70 % centrifugando entre lavados a 10,000 g por 15 min a 4 °C. Finalmente, la pastilla de ARN se secó y se disolvió en 50 µL agua destilada tratada con dietil priocarbonato 1 %. La integridad del ARN se evaluó bajo condiciones desnaturalizantes en gel de agarosa 1.2 % según Sambrook *et al.* (1989). La concentración se determinó mediante absorbancia, utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific®) y un factor de corrección de 40. Los RNAs con valores de 2.0 para las relaciones 260/280 y 260/230 se eligieron para el análisis de expresión subsecuente.

#### **4.13. PCR en tiempo real**

La determinación de los niveles de transcrito de los genes *PvINVCW3* y *PvINVCW4* se realizó en el LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la

Biodiversidad), CINVESTAV-Irapuato (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados) a partir del ARN total que se aisló de los racimos de vainas (pericarpios largos y cortos) recolectados en el período diurno (12 h) utilizando el protocolo de TriZol® antes descrito.

El cDNA se sintetizó a partir de 20 µg de RNA total usando la transcriptasa reversa SuperScript™ III (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y oligo(dT) como estrategia de priming. Se ensayaron cinco repeticiones biológicas y tres repeticiones técnicas. Las reacciones de amplificación de los genes consistieron en 20 ng de cDNA, 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y oligonucleótidos forward y reverse a 500 nM diseño específico a *PvINVCW3* y *PvINVCW4* según el Cuadro 4. El sistema de detección de RT-PCR en tiempo real fue ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) con condiciones de ciclaje térmico como siguen: un ciclo a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 40 s.

La abundancia relativa de transcritos se calculó y normalizó con respecto al gen de actina de *Phaseolus vulgaris* para exhibir los cambios en los niveles de expresión de *PvINVCW3* y *PvINVCW4*. Los datos se analizaron con base en los valores medios obtenidos de al menos tres reacciones de amplificación independientes y su error estándar. Se utilizó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  con una confianza de cuantificación relativa (RQ) establecida en 95 %. La eficiencia de amplificación (97.47 % a 100.02 %) para los conjuntos de oligonucleótidos se determinó mediante la amplificación de una serie de diluciones de cDNA (1:5). La especificidad de los productos de la q-PCR se determinó mediante el análisis de la curva de fusión con la adquisición continua de datos de fluorescencia durante la fusión de 65 a 95 °C.

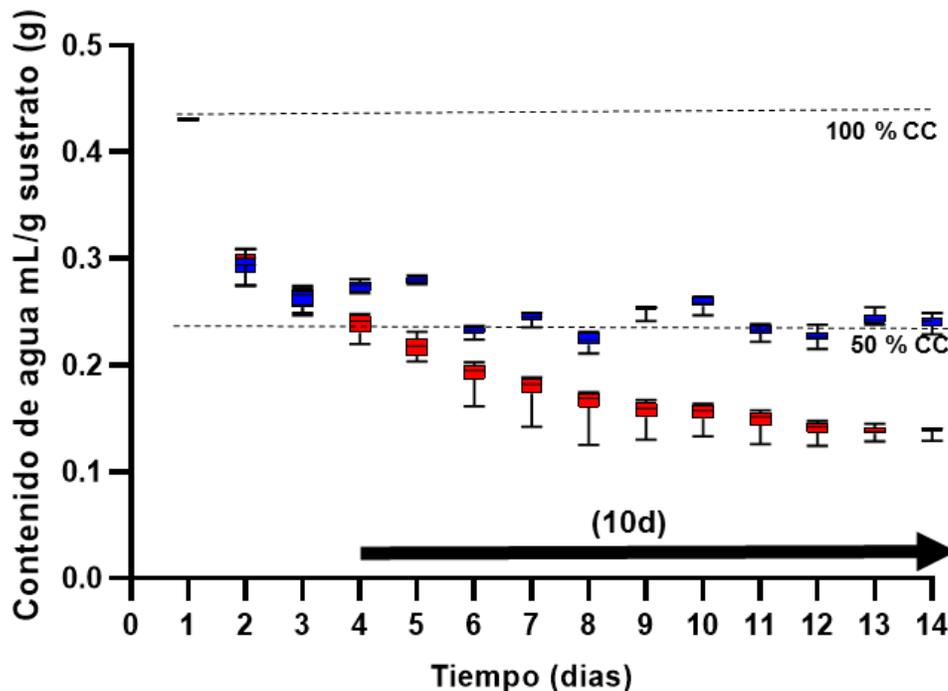
#### **4.14. Análisis estadístico**

Los datos provenientes de los tratamientos se analizaron mediante ANDEVA (en Excel) y prueba  $t$  de Student,  $P < 0.05$  (en InfoStat, versión 2020e) con cuatro repeticiones por tratamiento.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Pérdida de humedad en el sustrato

Los registros de pesos diarios de las macetas indicaron que la pérdida de humedad evaporada en 24 horas fue equivalente a 0.43 mL de agua g<sup>-1</sup> de suelo, para el tratamiento de 100 % CC y entre 0.15 y 0.22 mL de agua g<sup>-1</sup> de suelo, para el tratamiento de 50 % CC. En las plantas de este último tratamiento, la humedad fue decreciendo gradualmente hasta el día 4 y posteriormente mantuvieron 10 días algunas fluctuaciones (Figura 5).

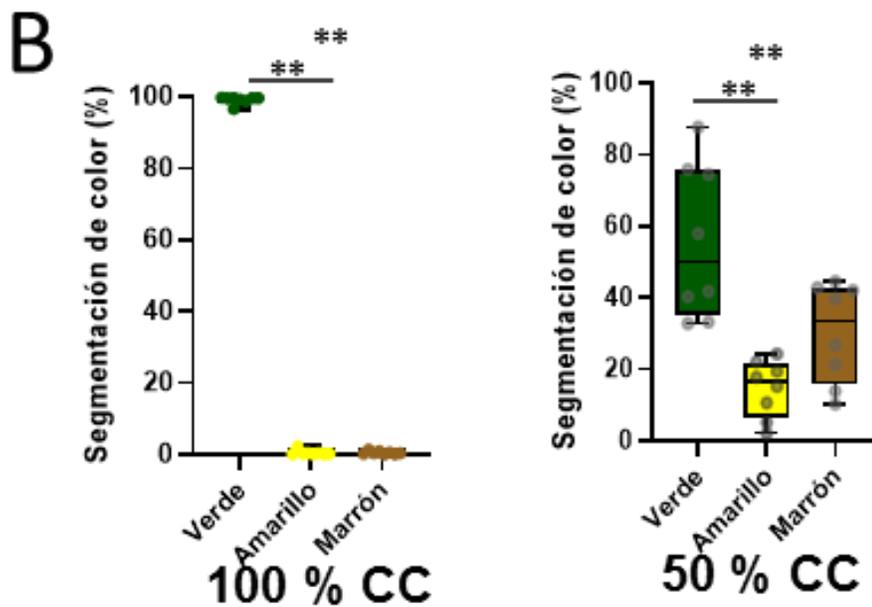
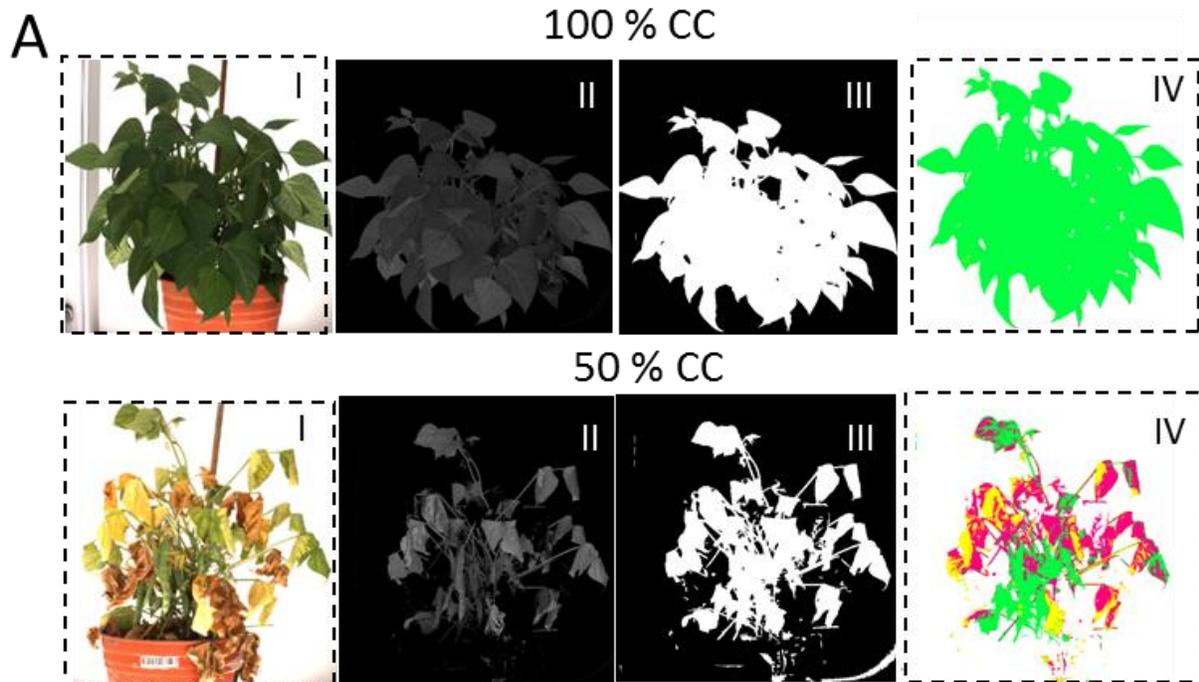


**Figura 5.** Pérdida de humedad diaria en suelo agrícola con plantas de frijol cv. OTI en etapa R8. El peso de las macetas se registró diariamente a las 8:30 am y se añadió el volumen de agua necesaria para mantener el nivel de 100 % de capacidad de campo (CC; cuadros azules) o 50% CC (cuadros rojos). Cada valor representa la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas. La flecha color negro indica los días que las plantas estuvieron en restricción de humedad. Las líneas punteadas indican el contenido de agua en los niveles 100 % CC y 50 % CC.

## **5.2. Determinación no destructiva del fenotipo con imágenes en RGB**

Con el propósito de evaluar el nivel de estrés en las plantas de ambos tratamientos, el total de las plantas fueron evaluadas con imágenes frontales en RGB (Figura 6A). Los resultados mostraron que el fenotipo del tratamiento 100 % CC no presentó síntomas de senescencia ya que mantuvo 100 % el color verde. En contraste, las plantas del tratamiento 50 % CC mostraron síntomas de senescencia severos en el total de las hojas e incluso con necrosis en algunas regiones en el periodo de los 10 días (Figura 6A).

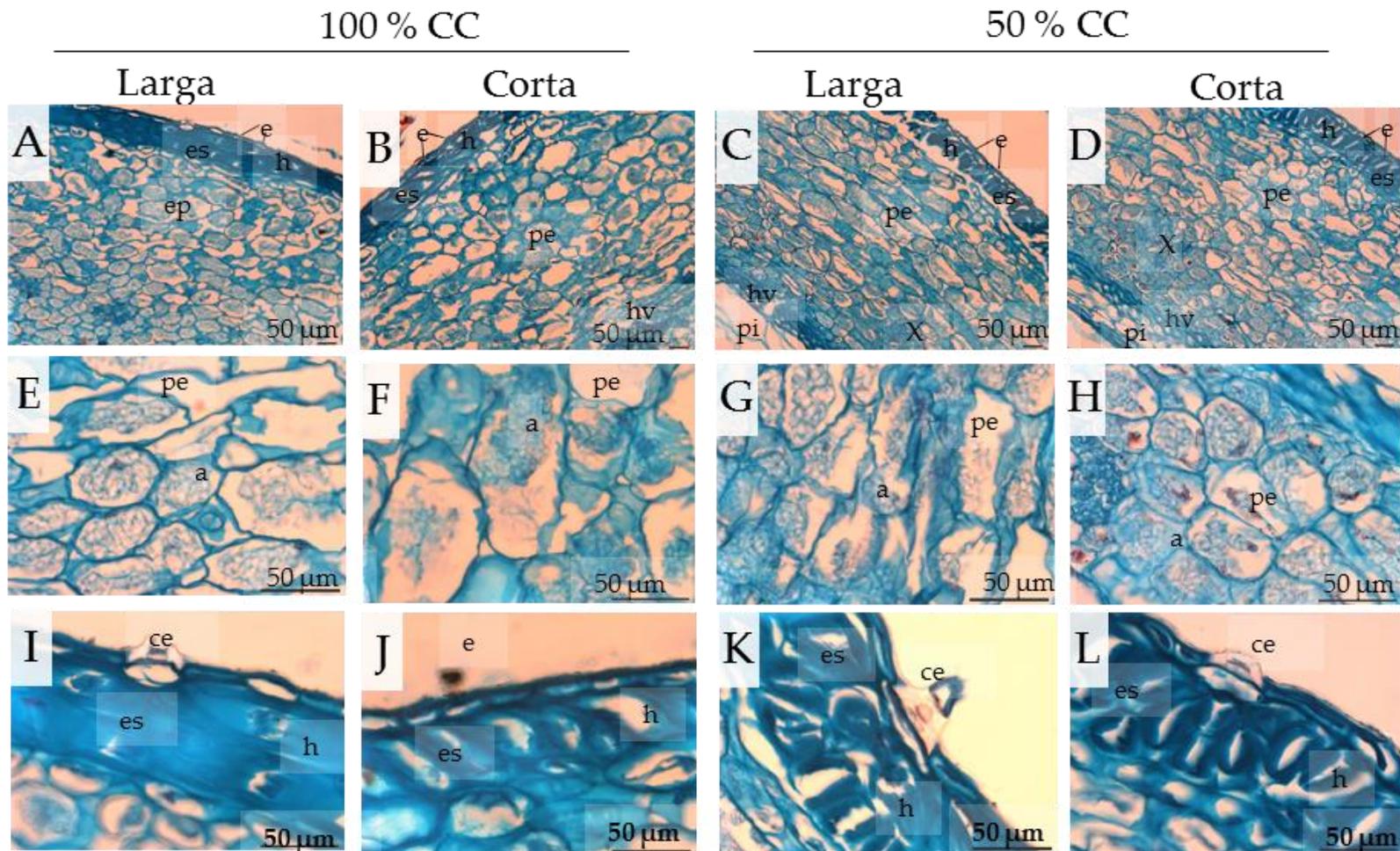
Sin embargo, las plantas estresadas mostraron alta variabilidad en el color; de acuerdo con los resultados del programa LemnaGrid, la variabilidad representó entre 40 y 70 % de color verde, 5 a 20 % de color amarillo y de 15 a 38 % de color marrón (Figura 6B). Las imágenes indicaron que la variabilidad en los resultados del tratamiento 50 % CC se debe al incremento gradual de la senescencia del follaje que propició la exposición de los frutos en las imágenes (Figura 6B). Estos resultados permiten sugerir que los frutos del cv. OTI contienen clorofila y probablemente son fotosintéticamente activos incluso cuando el follaje acelera la senescencia por déficit de humedad.



**Figura 6.** (A). Imágenes en RGB de plantas de frijol cv. OTI en suelo con 100% CC y 50% CC durante 10d analizadas por segmentación de color. Las imágenes fueron obtenidas con Scanalyzer PL y analizadas por el Software LemnaGrid. Se muestra la separación del primer plano y el fondo en la imagen (A-B I-II), que resulta en una imagen binaria (A-B III). Los objetos se separan según la clasificación de color (A IV, B IV). B. Gráficos con el porcentaje de color en verde (saludable), amarillo (senescencia) y marrón necrótico).  $n = 5$ .

### **5.3. Anatomía de los pericarpios de plantas en suelo con 100 % y 50 % CC**

Los resultados del análisis anatómico en los racimos con vainas largas y cortas revelaron que no hubo diferencias en la estructura celular entre las vainas largas y cortas y entre los tratamientos (Figura 7). La pared de la vaina se clasifica en tres capas de células funcionales, el exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio. Las imágenes muestran que el exocarpio (formado por células epidérmicas cutinizadas y células estomáticas (Belmont et al., 2022; Reeve y Brown, 1968)) fueron similares en los tratamientos y entre los tamaños de vaina (Figura 7A-D), de manera similar en el mesocarpio (compuesto por capas de células clorenquimáticas ricas en cloroplastos (Belmont et al., 2022)). Los gránulos de almidón en el parénquima externo fueron abundantes y pequeños; se localizados principalmente en el mesocarpio (Figura 7E-H). en cuanto al endocarpio consta de un número reducido de cloroplastos (Belmont et al., 2022). En la epidermis de las vainas, independientemente del tamaño de la vaina y del tratamiento del que formaron parte, presentaron cámaras estomáticas. Este resultado permite sugerir que los frutos se mantienen metabólicamente activos incluso cuando las hojas se encuentran en su totalidad senescentes (Figura 7I-L).

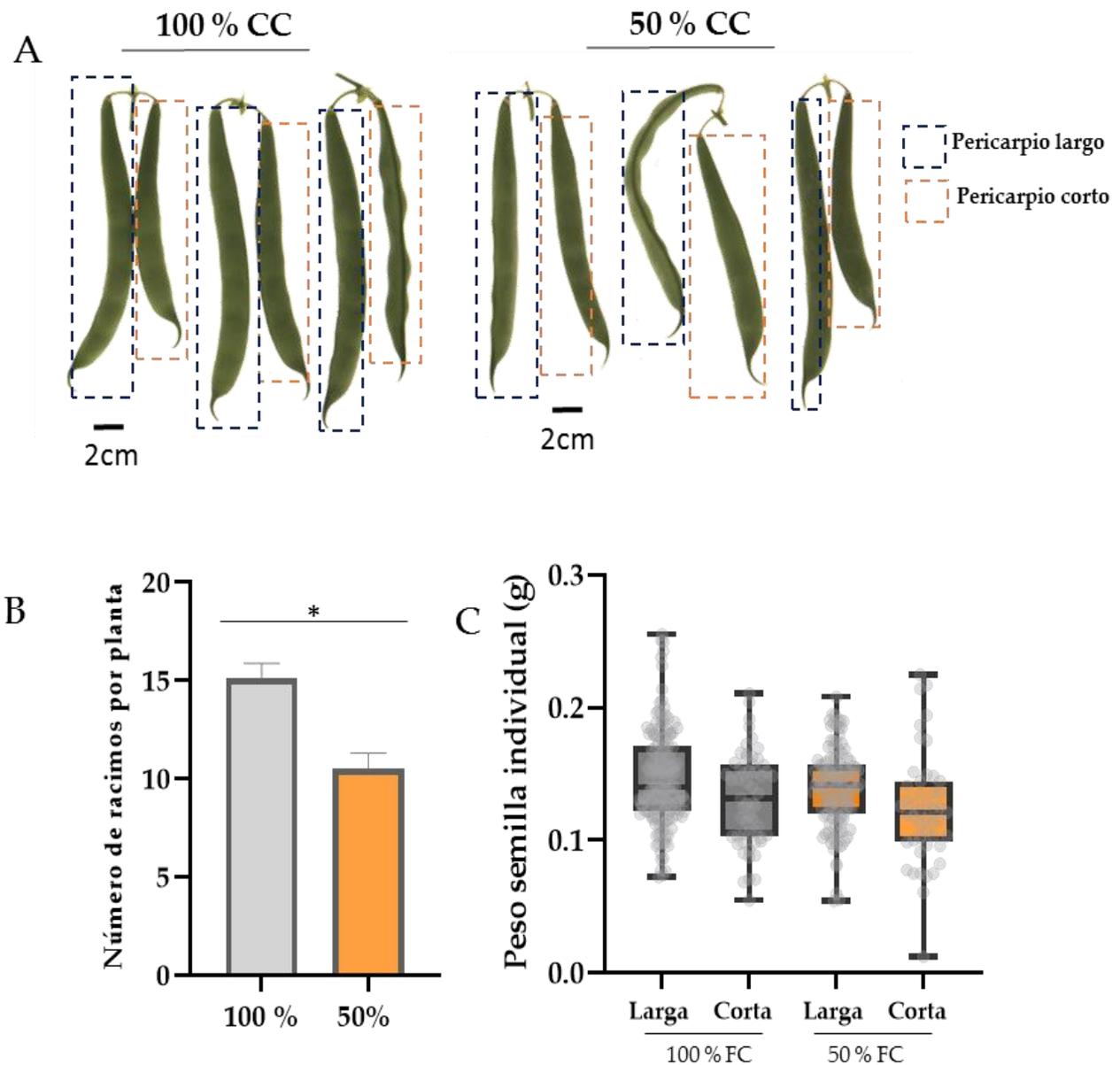


**Figura 7.** Análisis morfológico de pericarpios de vainas (largas y cortas) desarrolladas en plantas con suelo en 100 % de capacidad de campo (CC) y 50 % CC durante 10 días. A-D: corte transversal de los pericarpios en (10X). E-H: gránulos de almidón acumulados en plástidos (amiloplastos) ubicados en la parte interna del parénquima externo (40X). I-L: sección de la hipodermis con la cámara subestomatal (40X). e: epidermis. h: hipodermis. pe: parénquima externo. pi: parénquima interno. hv: haces vasculares. es: esclerénquima. ce: cámara estomática. a: almidón y x: xilema.]

#### **5.4. Producción de frutos y peso de semillas**

Las imágenes de los frutos en racimo no mostraron diferencias en el color o la apariencia general, independientemente de su desarrollo en las plantas con 50 % o 100 % CC. En todos los racimos de ambos tratamientos se desarrolló una vaina larga y corta con diferente número de semillas por vaina (Figura 8A). El número de racimos por planta disminuyó entre 15 y 20 % por efecto de la restricción de humedad (Figura 8B). La cuantificación de semillas mostró que la disminución del número de semillas entre frutos largos y cortos de ambos tratamientos no fue significativa.

En promedio, las vainas largas por planta del tratamiento 100 % CC produjeron 154 semillas; este valor disminuyó de manera no significativa a 124 semillas por planta con restricción de humedad. En contraste, en los frutos cortos de las plantas del tratamiento 100 % CC acumularon, en promedio, 57 semillas por planta y las de las plantas con restricción de humedad acumularon 49 semillas por planta y las diferencias tampoco fueron significativas (Figura 8C). Estos resultados indican que la pérdida de la capacidad fotosintética de las hojas en la etapa de llenado de vaina, por efecto del estrés por falta de agua, las semillas continuaron desarrollándose y la alteración de la relación fuente: demanda no fue significativa.



**Figura 8.** A. Racimos de vainas (frutos largos y cortos) de frijol cv. OTI, de plantas mantenidas con 100 % de capacidad de campo (CC) en etapa R8 o con 50 % CC durante 10 días; B. Racimos producidos ( $\pm$  EE) por planta en ambos tratamientos,  $n = 10$ ; C. Peso de las semillas en las vainas largas y cortas de ambos tratamientos. Cada valor representa la media  $\pm$  EE de cuatro réplicas (plantas).

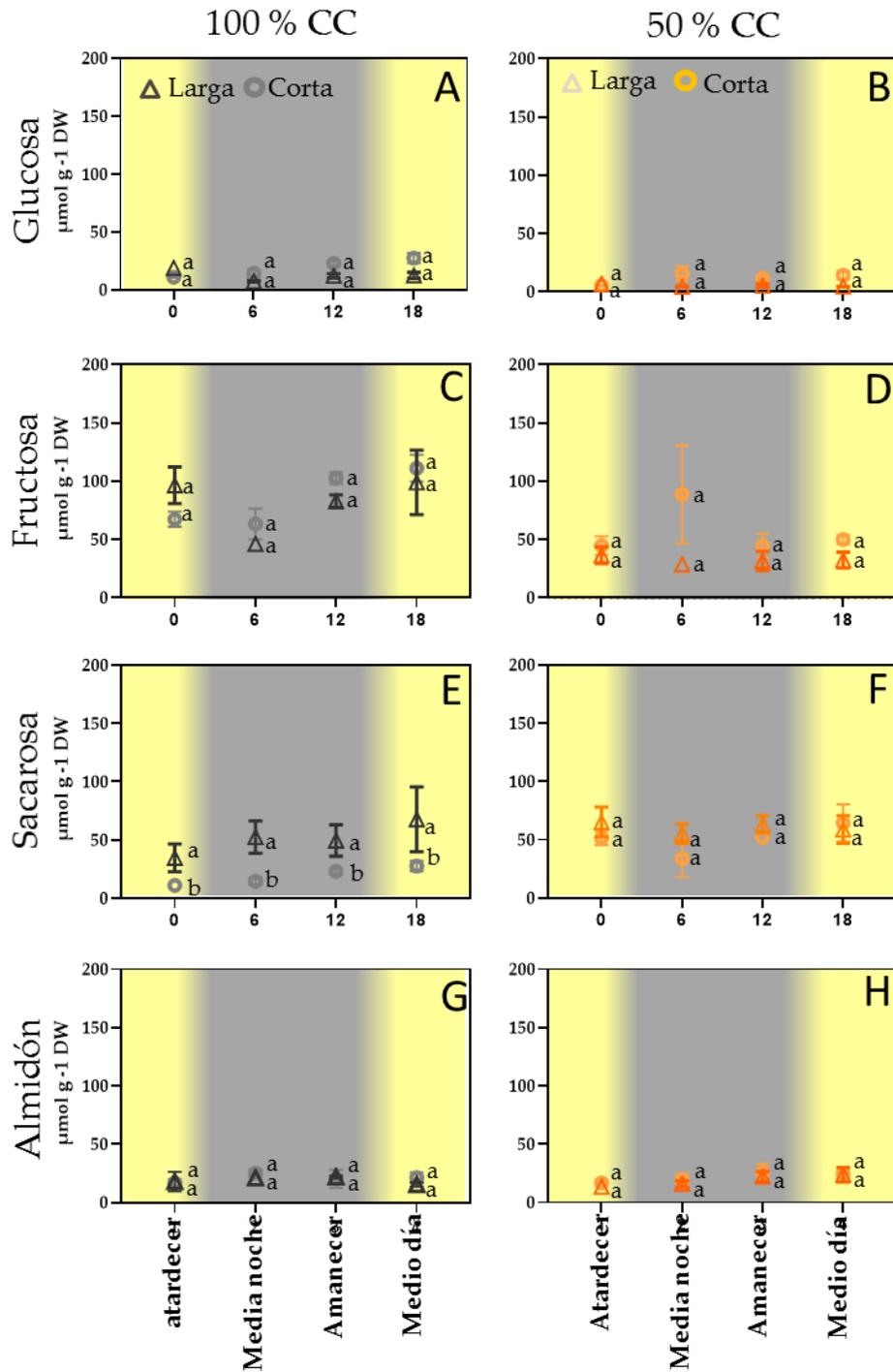
### **5.5. Variación diaria de los niveles de azúcares solubles y almidón en las valvas**

Las diferencias de la concentración de glucosa en las valvas de frutos largos de las plantas de ambos tratamientos no fueron significativas (en promedio  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$  de tejido seco, TS) en el ciclo diurno-nocturno (Figura 9AB). En los pericarpios de los frutos cortos, de las plantas sin restricción de humedad la concentración de glucosa fue significativamente mayor al amanecer y a medio día; en contraste, con la restricción de humedad la concentración del monosacárido en las valvas de los frutos cortos se mantuvo sin diferencias en el ciclo diurno-nocturno. Además, en promedio las concentraciones de glucosa fueron mayores que en las valvas de los frutos cortos respecto a las de los frutos largos ( $25$  a  $35 \mu\text{mol g}^{-1}$  de TS) (Figura 9 AB).

Los niveles de fructosa en pericarpios largos y cortos de plantas sin restricción de humedad, en promedio, fueron dos veces mayores que los de glucosa (Figura 9C). La concentración de fructosa en las valvas largas y cortas del tratamiento sin restricción de humedad se modificó significativamente en el ciclo diurno-nocturno; en el primer caso fue significativamente menor a media noche y en las valvas cortas los valores menores se presentaron del atardecer a media noche (Figura 9C). Estos valores fueron incluso mayores a  $100 \mu\text{mol g}^{-1}$  al amanecer y a media noche. Las concentraciones de fructosa en las valvas largas y cortas de las plantas con restricción de humedad permanecieron estables y disminuidos (menores a  $50 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) en el ciclo diurno-nocturno (Figura 9D).

La concentración promedio de sacarosa de las valvas largas de ambos tratamientos fue mayor respecto a las cortas (Figura 9EF). Además, la concentración del

disacárido varió significativamente en el ciclo diurno-nocturno en los pericarpios del tratamiento con 100 % CC, con los valores significativamente menores al atardecer y a media noche y cerca del doble al amanecer y a medio día. Sin embargo, estas valvas presentaron las concentraciones menores de sacarosa en el ciclo completo comparados con los de las valvas largas de ambos tratamientos y las cortas del tratamiento 50 % CC (Figura 9EF). La concentración de almidón en las valvas no cambió significativamente en ambos tamaños de ambos tratamientos. En general, la concentración menor del polisacárido se presentó al atardecer y tendió a incrementar de media noche a medio día (Figura 9GH).

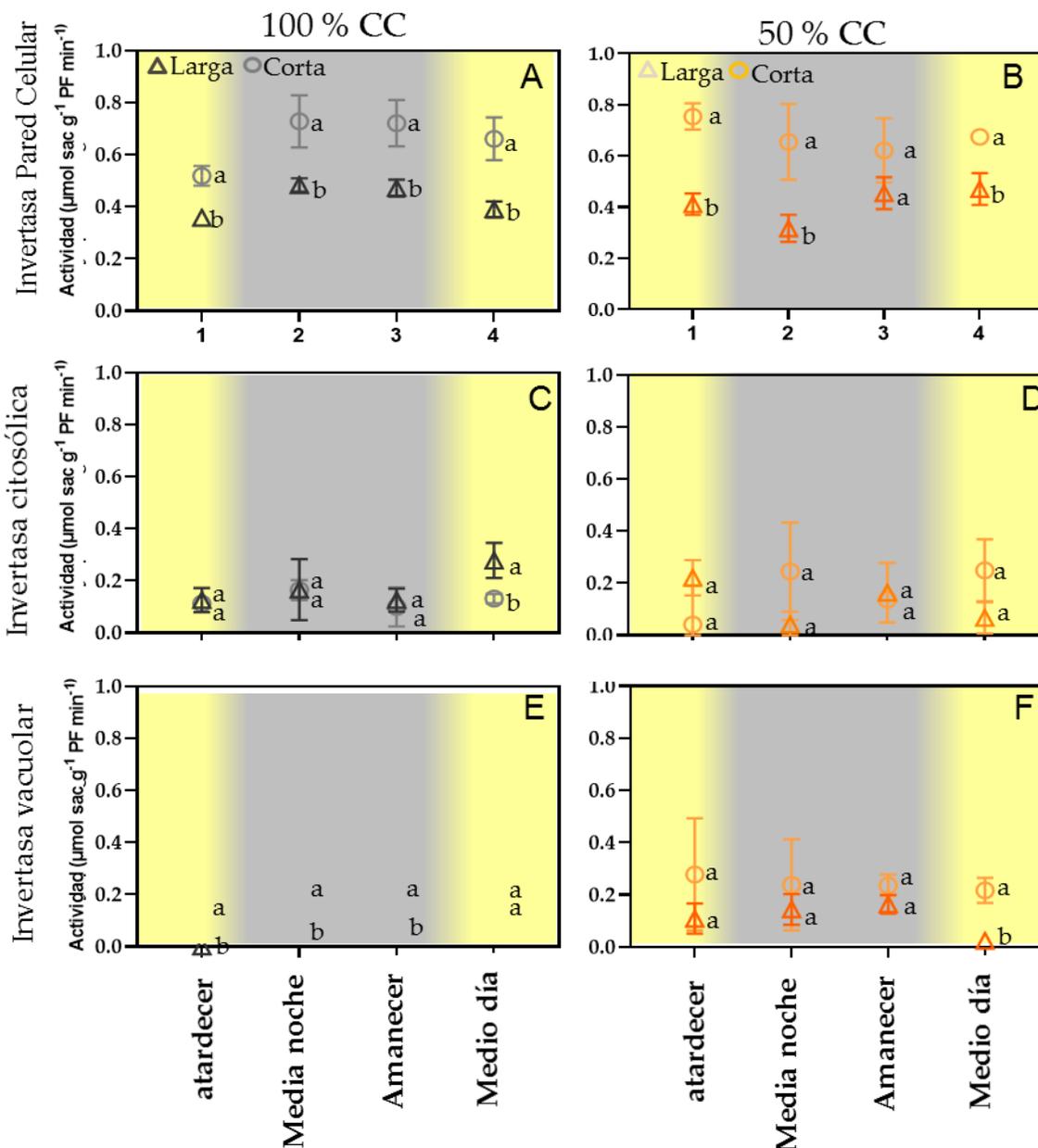


**Figura 9.** Concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón  $\pm$  EE en pericarpios de vainas (largas (triángulo) y cortas (círculo)) de racimos de plantas con 100 % de capacidad de campo (CC) (A, C, E y G) y 50% de CC (B, D, F y G) durante 10 días. Los racimos de las vainas se muestrearon al atardecer (18:00 h), medianoche (24:00 h), amanecer (6:00 h) y mediodía (12:00 h). Cada valor representa la media  $\pm$  EE de cuatro réplicas. Mismas letras sobre los cuadros indican similitud entre los tratamientos. (Prueba *t* de Student,  $P < 0.05$ ).  $n = 4$ .

## 5.6. Actividad enzimática de invertasas

Con el propósito de determinar si los cambios en glucosa y fructosa en las valvas están relacionados con el metabolismo de sacarosa se determinó la actividad enzimática de invertasa de la pared celular (CWINV), citosólica (CINV) y vacuolar (VINV) en esos tejidos de los frutos largos y cortos de ambos tratamientos (Figura 10). Los resultados mostraron que la actividad enzimática de invertasa CWINV en las valvas largas y cortas del tratamiento sin restricción de humedad aumentó significativamente en el periodo nocturno, es decir a media noche y al amanecer; aunque en las valvas cortas, la actividad permaneció alta hasta el mediodía. La actividad superó los  $0.6 \mu\text{mol sac g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$ , en las valvas de este tratamiento (100 % CC) y en las valvas largas la actividad de CWINV fue menor a  $0.5 \mu\text{mol sac g}^{-1} \text{PF min}^{-1}$  (Figura 10AB).

En general, la actividad de invertasa citosólica (Figura 10CD) y vacuolar (Figura 10EF), fueron inferiores a la actividad de invertasa de pared celular. La actividad CINV en el ciclo diurno-nocturno se mantuvo sin cambios significativos en las valvas de ambos tamaños y de ambos tratamientos. Además, en promedio las actividades de CINV fueron alrededor de la mitad de la actividad promedio de CWINV. La actividad de la invertasa vacuolar incrementó significativamente a medio día, respecto al resto del ciclo diurno-nocturno únicamente en las valvas largas del tratamiento sin restricción de humedad (Figura 10E): en el resto de valvas esta actividad VINV se mantuvo sin cambios significativos el ciclo. El valor promedio de la actividad invertasa vacuolar VINV fue intermedio entre los de las invertasas de pared celular y la citosólica (Figura 10).



**Figura 10.** Actividades de invertasas de pared, citosólica y vacuolar en pericarpios de vainas (largas (triángulo) y cortas (círculo)) de racimos de plantas con 100 % de capacidad de campo (CC) (A, C y D) y 50% de CC (B, D y F) durante 10 días. Los racimos de las vainas se muestrearon al atardecer (18:00 h), medianoche (24:00 h), amanecer (6:00 h) y mediodía (12:00 h). Cada valor representa la media  $\pm$ EE de cuatro réplicas. Mismas letras sobre las barras indican similitud entre los tratamientos, (Prueba *t* de Student,  $P < 0.05$ ).  $n = 4$ .

## 5.7. Identificación de secuencias de genes de invertasas de pared celular en el genoma de *P. vulgaris*

Con el propósito de identificar genes en el genoma de frijol que codifican a invertasas de pared celular; se descargó la secuencia del genoma de *P. vulgaris*, del sitio Phytozome V.13 y se comparó con las secuencias reportadas de esas invertasas de otras especies (Cuadro 2). El análisis mostró seis posibles secuencias de genes que codifican a invertasas con ID Phvul.003G217900.1, Phvul.010G137900.1, Phvul.007G227200.2, Phvul.001G036700.1, Phvul.001G191600.2 y Phvul.005G158500.1, a éstas se les asignó la nomenclatura: *PvINCW1*, *PvINCW2*, *PvINCW3*, *PvINCW4*, *PvINCW5* y *PvINCW6* respectivamente. Con la base de datos de Phytozome se obtuvieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a esos genes; lo que permitió determinar que la similitud de las secuencias homólogas está en el umbral de similitud mínima del 78 % (Cuadro 3).

Adicionalmente, las secuencias se analizaron con el programa PlantCAZyme, que permitió determinar características químicas que se muestran en el Cuadro 4. Los resultados confirmaron que las seis secuencias pertenecen a la familia de proteínas glucosil hidrolasas GH32, con longitud del marco de lectura abierto (ORF) de 1524-1926 pb, 575-652 aminoácidos y predicción de señal péptido con localización en el cloroplasto y puntos isoeléctricos (pI) que varían en el intervalo de pI 5.05 y pI 9.47(Cuadro 4).

**Cuadro 2.** ID de invertasas de plantas vasculares

<b>Especie</b>	<b>ID del gen</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G62660.1
	AT1G12240.1
	AT5G11920.1
	AT2G36190.1
	AT3G52600.1
	AT3G13790.1
	AT1G62660.1
	<u>AT1G12240.1</u>
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi1g09500.1
	Bradi5g09430.1
	Bradi5g09420.1
	Bradi3g44990.1
	Bradi2g61830.1
	Bradi3g46600.1
	Bradi4g07847.1
	<u>Bradi5g25270.1</u>
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.016G077400.1
	Potri.016G077500.1
	Potri.006G210600.1
	Potri.006G227500.1

<b>Especie</b>	<b>ID del gen</b>
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os03g52560.1
	LOC_Os04g33720.1
	LOC_Os04g33740.1
	LOC_Os02g33110.1
	LOC_Os01g73580.1
	LOC_Os04g56930.1
	LOC_Os04g56920.1
	LOC_Os09g08120.1
	<u>LOC_Os09g08072.1</u>
<i>Zea mays</i> L	GRMZM2G139300_T01
	GRMZM2G119689_T01
	GRMZM2G123633_T01
	GRMZM2G119941_T01
	GRMZM2G095725_T01
	GRMZM2G018692_T01
	GRMZM2G018716_T01
	<u>GRMZM2G174249_T01</u>
<i>Carica papaya</i>	evm.TU.supercontig_249.5
	evm.TU.supercontig_104.108

**Cuadro 3.** ID de invertasas de pared celular y porcentaje de similitud de las familias con *Phaseolus vulgaris*

Propuesta de nombre	ID del gen	Similitud (%)	ID <i>Phaseolus vulgaris</i>	Referencia
<i>PvINVCW1</i>	AT1G12240	82.60%	Phvul.003G217900.1	(Qi , et al., 2007)
<i>PvINVCW2</i>	AT3G13790	78.40%	Phvul.010G137900.1	(Qi , et al., 2007)
<i>PvINVCW3</i>	Potri.016G077500.1	80.40%	Phvul.007G227200.2	(Chen et al., 2015)
<i>PvINVCW4</i>	Potri.006G210600.1	82,7%	Phvul.001G191600.2	(Chen et al., 2015)
<i>PvINVCW5</i>	Potri.006G227500.1	78,7%	Phvul.001G036700.1	(Chen et al., 2015)
<i>PvINVCW6</i>	Potri.006G227400.1	78.50%	Phvul.005G158500.1	(Chen et al., 2015)

**Cuadro 4.** Oligonucleótidos específicos de genes utilizados para ensayos cuantitativos de RT-PCR

Gen	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
<i>PvINVCW3</i>	GGACGGACATTGGAGGATATTG	AATGGATCGGGTGCTTGAC
<i>PvINVCW4</i>	CAATGTTACGCTGTACCCGAAGA	CGCACTGCCGTTTACTTCTT
<i>ACTIN</i>	TGCATACGTTGGTGATGAGG	AGCCTTGGGGTTAAGAGGA G

**Cuadro 5.** Información detallada de los genes de la familia *CWINV* del frijol

Nombre en este trabajo	Locus ID	Localización	Longitud de la secuencia				Familia	Peso molecular	Punto isoeléctrico
			DNA (bp)	mRNA (bp)	CDS (bp)	Proteína (aa)			
<i>PvINVCW1</i>	Phvul.003G217900.1	Chr03:44577343..44581434 reverse	4091	2448	1956	652	GH32	72.63	6.47
<i>PvINVCW2</i>	Phvul.010G137900.1	Chr10:42023601..42028333 reverse	4732	1823	1689	563	GH32	63.51	9.82
<i>PvINVCW3</i>	Phvul.007G227200.2	Chr07:35070399..35075678 forward	5279	1922	1764	588	GH32	58.65	9.47
<i>PvINVCW4</i>	Phvul.001G191600.2	Chr01:45038437..45040759 forward	2322	1850	1524	508	GH32	64.83	8.98
<i>PvINVCW5</i>	Phvul.001G036700.1	Chr01:3435432..3438180 reverse	2748	1859	1686	562	GH32	64.12	5.05
<i>PvINVCW6</i>	Phvul.005G158500.1	Chr05:38694474..38697361 reverse	2887	2007	1725	575	GH32	64.65	8.42

## 5.8. Alineamiento de secuencias de invertasas de pared celular e identificación de motivos

Los resultados del BLAST de aminoácidos de las seis invertasas de pared celular indicaron la presencia de 13 motivos con aminoácidos iguales en las seis secuencias (Figura 11). Los motivos reportados por Cortés-Romero *et al.*, (2012) son relevantes en la estructura y actividad de las enzimas; se identificó el motivo RPD, que fue idéntico en las seis secuencias que pertenecen a la familia de proteínas de  $\beta$ -fructofuranosidasa (Figura 11).

El motivo NDPNG no presentó cambios en todas las secuencias, excepto en la secuencia *PvINCW4*, la cual tuvo una sustitución del residuo G por A y ausente en la secuencia que corresponde a *PvINCW5*. Similarmente el motivo WECP también fue identificado en las secuencias (Figura 11); en este caso, la secuencia *PvINCW4* tuvo una sustitución del residuo W por C presentando el motivo CECF (Figura 11).



## 5.9. Análisis filogenético de secuencias de invertasas

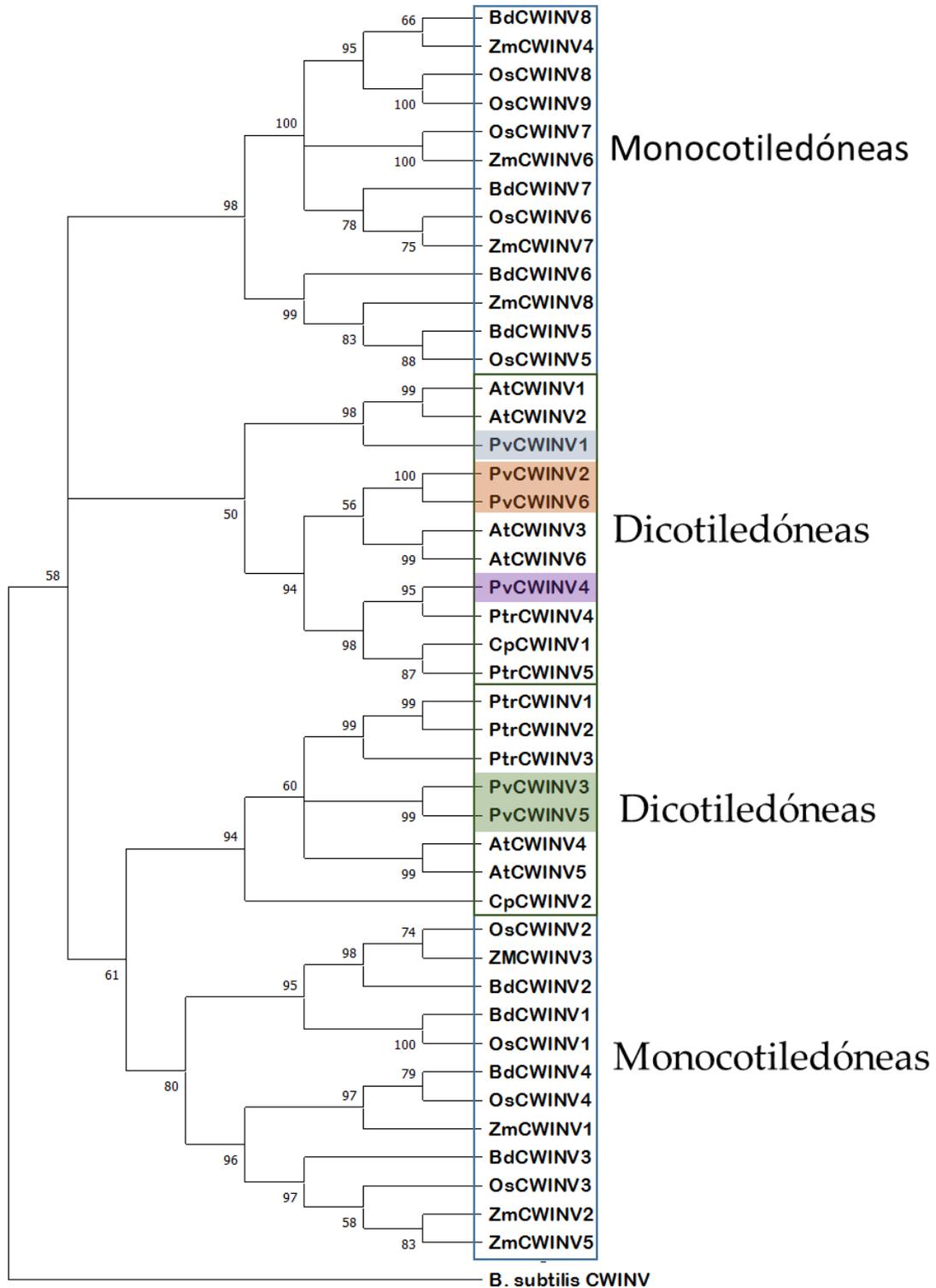
Para reconocer las relaciones evolutivas entre los genes *CWINV* del frijol y otras especies de plantas, 50 secuencias de aminoácidos de seis especies de plantas vasculares fueron analizadas, esto permitió identificar la relación filogenética entre las invertasas de las especies (Cuadro 3). El árbol filogenético, construido con el modelo evolutivo WAG+G, mostró que todas las plantas formaron un grupo monofilético; esto indicó que los genes *CWINV* de plantas se originaron del mismo ancestro. La Figura 12 muestra tres grandes clados que se recuperaron con soporte alto (PP =X). Cada uno de estos clados, a su vez se dividió en dos subclados monofiléticos, lo que corresponden a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las secuencias de invertasas mostraron que la secuencia *PvINVCW1* tiene relación cercana con las de *PvINVCW2* y *PvINVCW6* y *PvINVCW3* es cercana a *PvINVCW5*. La secuencia *PvINVCW4* fue agrupada en el grupo cercano a *PvINVCW2* y *PvINVCW6*.

## 5.10. Determinación de los niveles de transcritos de los genes *PvINVCW3* y *PvINVCW4* por RT-qPCR

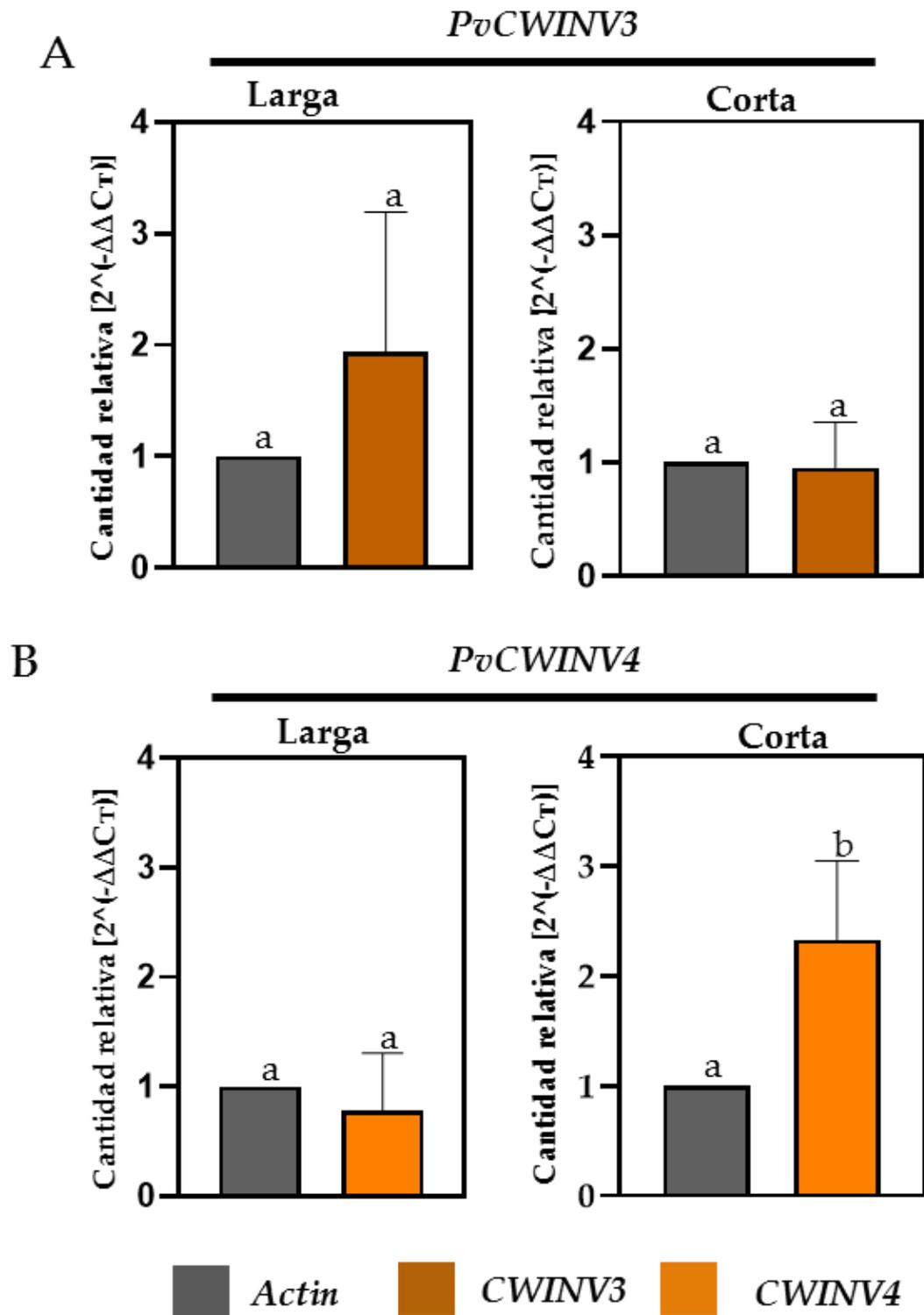
Con base en los resultados anteriores, se eligieron los genes *PvINVCW3* y *PvINVCW4* para medir por RT-qPCR los niveles de transcrito en valvas largas y cortas con y sin restricción de humedad. Ambos genes tuvieron mayor porcentaje de similitud con invertasas reportadas en otras especies (Cuadro 2) y sustituciones de residuos de aminoácidos en los motivos relacionados con la actividad de esas enzimas (Figura 13).

Además, en las valvas largas, la expresión de los genes *PvINVCW3* y *PvINVCW4* no presentó cambios significativos en respuesta a la restricción de humedad (Figura 13).

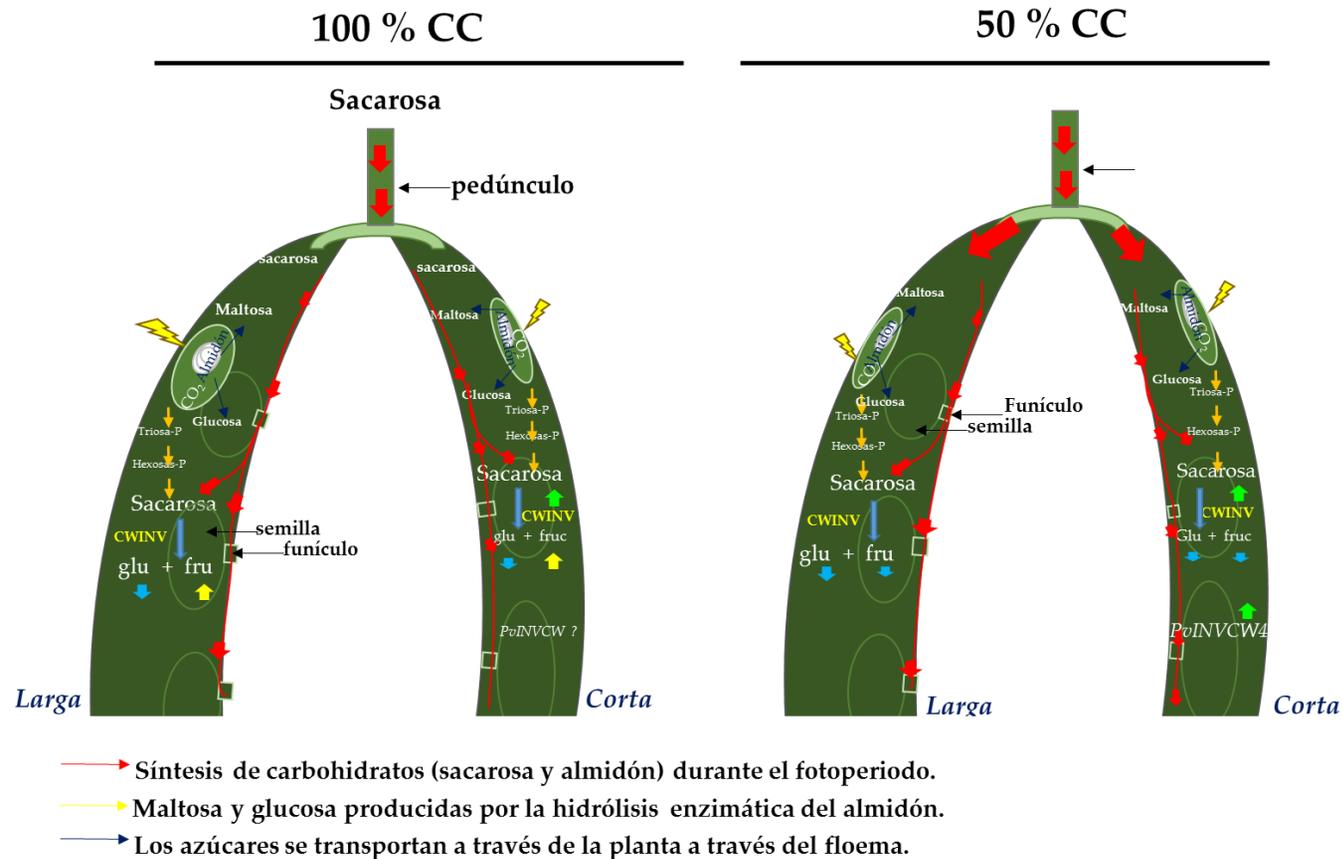
En los frutos cortos, los niveles del transcrito del gen *PvINVCW3* no tuvieron diferencias significativas con respecto a las valvas del tratamiento sin restricción de humedad. Sobresalió que el gen *PvINVCW4* aumentó casi al doble los niveles del transcrito en respuesta a la restricción de humedad, respecto a las valvas de los tratamientos sin restricción de humedad (Figura 13).



**Figura 12.** Árbol filogenético construido con el método NJ, con el programa MEGAX 5.2.2, basado en secuencias proteicas de *Phaseolus vulgaris* e invertasas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas e invertasas de la pared celular de la bacteria *B. subtilis* como grupo externo. Los números de acceso se proporcionan en el Cuadro 2.



**Figura 13.** Perfiles de expresión de RT-qPCR de los genes de invertasa de *Phaseolus vulgaris* *CWINV3* y *CWINV4* en valvas largas y cortas, usando como referencia el valor del gen Act 11 como control en cada condición y 100 % CC como condición de control. Los conjuntos de vainas se cosecharon al mediodía (12:00 p. m.) y cada valor representa la media  $\pm$  EE. de tres réplicas biológicas (prueba t de Student, \*P < 0,05).



**Figura 14.** Modelo representativo de las vías múltiples del metabolismo del carbono de racimos al 100 % capacidad de campo (CC) y 50 % CC en el llenado de grano. En primer lugar, la fotosíntesis en pared de la vaina para síntesis de almidón y sacarosa. En segundo lugar, los productos de la hidrólisis del almidón (maltosa y hexosa) podrían utilizarse para el metabolismo del carbono en las semillas. En tercer lugar, la sacarosa es cargada en el pedúnculo y se distribuye en vainas grandes y pequeñas. Posteriormente, en el apoplasto, la sacarosa es degradada por la invertasa de pared celular (CWINV) y probablemente las hexosas se usan para el llenado del grano. La actividad de CWINV aumentó en la pared de la vaina corta (VC) independientemente del régimen hídrico, pero los niveles de fructosa disminuyeron en la pared de la vaina larga (VL) y (VC) bajo restricción de agua. Los niveles de transcripción de ARNm del gen PwCWINV4 fueron consistentes con una alta actividad enzimática en VC al 50 % de CC, pero este incremento no fue imitado en la pared de la VL. Estos hallazgos sugieren que las isoformas de CWINV podría participar en la degradación de la sacarosa.

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

### 6.1. Fenotipo y anatomía de los racimos de frutos de plantas con y sin restricción de humedad

Entre las leguminosas, el frijol es el cultivo que más se afecta con las sequías, lo que conduce a las pérdidas mayores del rendimiento (Beebe *et al.*, 2013). La falta de humedad en el suelo impacta severamente en la producción de flores y vainas, por lo tanto, en el número de semillas producidas por planta (Clavijo *et al.*, 2013). El análisis de fenotipaje, no destructivo, por imágenes en RGB (Figura 6), mostró que después de los 10 días con 50 % CC el follaje cambió de verde a amarillo, incluso con regiones necróticas; en contraste, en las plantas sin restricción de humedad permaneció verde (Figura 6B).

Sin embargo, los análisis señalaron que vainas de las plantas con restricción de humedad permanecieron verdes por más tiempo que el resto de la planta; esto permite sugerir que estas estructuras, en las condiciones evaluadas mantienen cierta actividad fotosintética, en caso de que la maquinaria fotosintética de esas estructuras reproductivas esté activa. Al respecto, diversos estudios han identificado la permanencia del color verde de la planta, conocido como "Stay Green", como un carácter agronómico (Sehgal *et al.*, 2018; Thomas y Ougham, 2014; Assefa *et al.*, 2013). La permanencia de color verde en las vainas en frijol varía entre cultivares (Cayetano Marcial *et al.*, 2021).

Para confirmar si el verdor de las vainas se relaciona con la integridad de su estructura celular, se analizó la anatomía en cortes trasversales de las vainas largas y cortas de las plantas con y sin restricción de humedad (Figura 7). Las imágenes de los

cortes en la figura 7 AD mostraron que, a pesar de la restricción de humedad por 10 días, las vainas no tuvieron alteraciones en la epidermis, la hipodermis, ni en el parénquima interno y externo, o en los gránulos de almidón (Figura 7 EH). En la epidermis de las vainas, de ambos tamaños y de ambos tratamientos, se observaron cámaras estomáticas, que, aunque falta comprobar su funcionalidad, la presencia uniforme permite sugerir que, aunque el follaje esté completamente senescente, la anatomía de las vainas no se altera por efecto del déficit de humedad. Estas observaciones coinciden con otros estudios, como los que se han documentado en alfalfa (Wang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016), en garbanzo y algunas especies de *Brassica* (Singal *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado que la vaina es una estructura fotosintéticamente activa, que proporciona carbono a las semillas cuando las condiciones son adversas, e incluso se ha considerado como criterio de selección de cultivares de frijol en condiciones de restricción de humedad (Assefa *et al.*, 2013).

## **6.2. Producción de frutos y semillas**

El número de racimos por planta disminuyó significativamente entre los tratamientos. Esto indicó que el estrés que generó el déficit de humedad con 50 % CC durante 10 días, en la etapa R8, generó abscisión de vainas (Figura 8A). Las imágenes de la Figura 8B indican que las diferencias en el tamaño de los frutos y el número de semillas por vaina se mantuvo en riego (5-6 semillas por vaina) y en restricción de humedad (3-4 semillas por vaina) (Figura 8C). Recientes investigaciones con <sup>14</sup>C revelaron que, con restricción de humedad, los frutos en etapas intermedias de desarrollo tuvieron cambios significativos en el metabolismo de sacarosa y almidón con respecto a las etapas iniciales (elongación) y avanzadas (maduras) (Morales-Elias *et al.*, 2021).

Estos resultados confirman que 26 a 29 DDA los frutos de frijol tienen metabolismo de carbono activo a pesar de la nula actividad fotosintética del follaje en la planta.

Respecto al peso de las semillas, los resultados mostraron que los frutos cosechados de las plantas con restricción de humedad redujeron el número, pero no el peso individual de la semilla. Esto indica que las semillas completan su desarrollo independientemente del estrés por déficit de humedad y suspenden o limitan la asimilación de aquellas semillas con desarrollo tardío y favorecen a las que están en proceso de llenado. Estos resultados coinciden con los de estudios que han evaluado genéticamente la formación de la semilla, demostrando que el tamaño de la semilla es un carácter genéticamente marcado en los cultivos (Sehgal *et al.*, 2018).

### **6.3. Azúcares solubles y almidón**

Con el fin de explorar el papel del pericarpio en el desarrollo de los frutos durante el ciclo diurno-nocturno, en la vaina larga y corta del mismo racimo se cuantificó la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón (Figura 9). Los resultados mostraron que los niveles de glucosa se mantuvieron bajos en los dos tamaños de vainas independientemente del nivel de humedad y hora del día, en contraste el contenido de fructosa sin restricción de humedad varió con la luz y oscuridad naturales; los pericarpios de vainas largas y cortas acumularon menos fructosa al final del día y durante toda la noche y alcanzó un máximo a medio día (Figura 9CD). En contraste, con el efecto de la restricción de humedad los niveles de fructosa se mantuvieron bajos en los cuatro muestreos (Figura 9CD). Estos resultados indican que el uso de glucosa y fructosa en las vainas es metabólicamente diferente (Figura 9AD). Los niveles elevados de fructosa

en pericarpios de frijol han coincidido con los documentados previamente en respuesta al estrés por déficit de humedad (Morales-Elias *et al.*, 2021) y durante el proceso de formación de cromoplastos durante el desarrollo de la semilla (Belmont *et al.*, 2022).

En las plantas, las hexosas (glucosa y fructosa) son generadas por la actividad de invertasas; elucidar el papel metabólico o señalizador de esos azúcares puede complicarse, dado que se metabolizan rápidamente y son sustrato para la síntesis de otras moléculas. Sin embargo, investigaciones recientes indican que la fructocinasa, que realiza la misma reacción que la HXK está involucrada en la modulación del crecimiento en plantas y uso de la fructosa como regulador de la fructosa 1,6 fructocinasa (Cho y Yoo, 2011). En el presente estudio, no se descarta que la fructosa participe en la regulación del crecimiento del fruto, lo que genera nuevas preguntas de investigación.

Respecto a los niveles de sacarosa, los cambios significativos entre los pericarpios largos y cortos en el ciclo diurno-nocturno (Figura 9EF) permiten sugerir que con estrés por déficit hídrico la sacarosa se acumula vía descarga desde el floema o sintetizada a partir de las triosas fosfato producidas por la fotosíntesis. Investigación en flores y semillas han demostrado que la sacarosa es indispensable para la formación de estructuras del pistilo de la flor de algodón y desarrollo de semillas (Boyer y McLaughlin, 2007). En maíz, la sequía generó severa aborción de ovarios, al aplicar sacarosa en el tallo se restableció parcialmente la aborción (McLaughlin y Boyer, 2004). Las observaciones en este estudio apuntan a que las vainas cortas y largas de las plantas con restricción de humedad mantienen las células de conducción iguales que las desarrolladas sin restricción de humedad (Figura 7); por lo que, el contenido de sacarosa elevado permite sugerir que las vainas son metabólicamente activas.

El contenido de almidón en los pericarpios largos y cortos no mostró cambios significativos entre niveles de humedad ni durante el ciclo luz-oscuridad (Figura 9GH). Estos resultados son consistentes con los reportados recientemente por Morales-Elias *et al.* (2021); ese estudio mostró que los frutos en etapas tempranas de desarrollo fueron los que redujeron la cantidad de almidón con respecto a frutos en desarrollo avanzado. En contraste, Cuellar-Ortiz *et al.* (2008) reportaron que en los pericarpios los niveles de almidón aumentaron en respuesta a sequía en el cultivar tolerante al déficit hídrico, demostrando que el contenido de almidón varía entre cultivares. Sin embargo, el conocimiento sobre el mecanismo que regula la exportación de los productos de degradación del almidón es parcial.

#### **6.4. Actividad enzimática de invertasas**

Debido a que la relación sacarosa: hexosas impactan en el desarrollo de frutos y tejidos de demanda, en el presente estudio se evaluó la actividad de invertasa identificada como una de las dos enzimas que degradan a la sacarosa; invertasa (INV) que produce glucosa y fructosa y sacarosa sintasa (*SUS*). Los resultados mostraron que la actividad de invertasa vacuolar y citosólica no tuvieron cambios significativos (Figura 10CF). En contraste, la actividad de invertasa de pared celular fue estadísticamente superior en pericarpios de menor tamaño con y sin restricción de humedad, mientras que las vainas largas en ambos niveles de humedad fueron inferiores (Figura 10AB).

Estos resultados permiten sugerir que la actividad de invertasa de pared celular aumenta en tejidos en los que la fuerza de demanda es mayor, independientemente del nivel de estrés de las plantas. Actualmente, los especialistas conocen que la invertasa

de pared celular (CWINV) controla el crecimiento y desarrollo, principalmente en tejidos reproductivos en *Arabidopsis thaliana* (Sherson *et al.*, 2003), haba (*Vicia faba*) (Borisjuk *et al.*, 2004), maíz (*Zea mays*) (McLaughlin 2004) y zanahoria (*Daucus carota*) (Tang *et al.*, 1999). Las evidencias indican que en estos tejidos la descarga es vía apoplasto, en el que la degradación de la sacarosa por la invertasa de pared celular genera hexosas que son incorporadas por transportadores tipo simporte H<sup>+</sup>/, conocidos como STPs y que en conjunto pueden activar vías de señalización. Sin embargo, en *Arabidopsis* la presencia de seis genes de CWINV y catorce STPs ha dificultado el estudio, debido a la redundancia entre isoformas (Geiger, 2020). Adicionalmente, la sobre expresión de los genes *AtGI1*, *OsGIF1* y *Mn1* en *Arabidopsis*, arroz, maíz respectivamente regulan el rendimiento y calidad de los granos durante etapas tempranas del llenado de semilla (Chourey *et al.*, 2012; Lammens *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

En frijol espárrago (*Vigna unguiculata ssp. sesquipedialis*) la actividad de invertasa de pared celular en el pericarpio fue contrastante en dos genotipos; este resultado indica que los productos de la degradación de la sacarosa, glucosa y fructosa, participan en el desarrollo de la semilla (Liu *et al.*, 2012). En frutos de frijol y otras leguminosas el papel de las invertasas es escasamente conocido, los resultados del presente estudio indican que la actividad elevada de CWINV en frutos cortos de plantas con y sin restricción de humedad se deben a la mayor fuerza de demanda en la etapa de llenado de la semilla (Figura 10).

## 6.5. Análisis bioinformático de invertasas de pared celular en el genoma de frijol

Con el propósito de conocer el número de secuencias que codifican a invertasas de pared celular en el genoma de frijol. Se descargó la secuencia del genoma de *P. vulgaris* en el sitio gratuito de Phytozome V.13 y a partir de la comparación de secuencias reportadas en las especies incluidas en el Cuadro 2, se obtuvieron seis secuencias con similitud mínima del 78%. Con las secuencias de los genes identificadas en el genoma de frijol se obtuvieron las secuencias de aminoácidos las cuales fueron usadas para realizar alineamientos. El análisis mostró alta similitud entre las secuencias (Figura 11).

Sin embargo, una estructura intron/exón de algunas fructosiltransferasas e invertasas incluyen la presencia de un mini exón de 9 pb que codifica para tres aminoácidos (DNP) el cual constituye parte del motivo WMNDPNG que determina la especificidad al sustrato (Cortes-Romero *et al.*, 2012), en la secuencia de *PvuICWINV4* mostró una sustitución en el motivo de G por A (Figura 11). Este mini exón mostró que en plantas de papa presenta splicing alternativo en estrés por frío (Bournay *et al.*, 1996) y una variante de splice a diferente exon-intron fue observado en algodón (Taliercio *et al.*, 2010). De forma similar, los resultados mostraron otros motivos RPD y EC idénticos en las seis secuencias identificadas en frijol. Adicionalmente, en el motivo WECP, el cual ha sido reportado cerca del extremo carboxilo terminal (Cortes-Romero *et al.*, 2012), en el presente trabajo se observó el motivo en las secuencias de frijol, el cual fue tuvo una sustitución de W por C, tal motivo ha sido identificado como motivo de las fructofuranósidos. Finalmente, el análisis filogenético mostró que las secuencias de invertasas se encuentran en el clado de dicotiledóneas (Figura 12). La distancia evolutiva

entre ellas muestra que las secuencias de *PvINVCW3* y *PvINVCW5* son distantes con las de *PvINVCW1*, *PvINVCW2* y *PvINVCW6* mismas que fueron distantes con la de *PvINVCW4*.

Se determinó el incremento de niveles de transcrito determinados por RT-qPCR de los genes *PvINVCW3* y *PvINVCW4* en vainas largas y cortas en riego y restricción de humedad. La expresión relativa se calculó con base en los incrementos en vainas en restricción de humedad con respecto a los determinados en riego. Los resultados demostraron que el gen *PvINVCW3* no tuvo diferencias significativas en vainas cortas y largas mientras que los niveles de transcritos del gen *PvINVCW4* fueron superiores en vainas cortas (Figura 13). Este resultado sugiere que la regulación de la fuerza de demanda de la sacarosa en vainas cortas bajo restricción de humedad es superior en comparación a las vainas largas poniendo en evidencia la posibilidad de que los bajos niveles de fructosa estén relacionados con este hecho. En el caso de las vainas largas que también tuvieron niveles bajos de fructosa (Figura 9C) posiblemente otras isoformas de invertasa podrían estar participando.

## VII. CONCLUSIÓN

El efecto de la restricción de humedad durante el llenado de la vaina y desarrollo de la semilla, o etapa R8 provoca abscisión de ciertos frutos, quizá los que están en etapas iniciales de desarrollo y las que permanecen en la planta mantienen las características morfológicas y anatómicas similares independientemente del régimen de riego, pero las valvas disminuyen el contenido de fructosa por efecto del déficit de humedad, respecto a las vainas desarrolladas en riego. Estos cambios pueden estar asociados a la actividad de invertasa de pared celular (CWINV), que de acuerdo al genoma reportado en Phytozome, seis secuencias codifican a CWINV en *Phaseolus vulgaris*. La secuencia PvINVCW4 posee sustituciones en residuos clave del sitio de catálisis de la enzima y aumenta los niveles de expresión en respuesta a la restricción de humedad en vainas cortas con menos número de semillas. En general, los resultados indican que la distribución de fotoasimilados en un racimo, las vainas largas y cortas regulan la fuerza de demanda debido a la expresión diferencial de isoformas de invertasas. En el futuro, se investigará otras enzimas clave que participan en el metabolismo de la sacarosa y el almidón, así como las isoformas de esas enzimas.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. Al-Sheikh Ahmed, S., Zhang, J., Ma, W., & Dell, B. (2018). Contributions of TaSUTs to grain weight in wheat under drought. *Plant Molecular Biology*, 98(4–5), 333–347. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0782-1>
2. Aluko, O. O., Li, C., Wang, Q., & Liu, H. (2021). Sucrose utilization for improved crop yields: A review article. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4704. <https://doi.org/10.3390/ijms22094704>
3. Andrews, A. K., & Svec, L. V. (1975). Photosynthetic activity of soybean pods at different growth stages compared to leaves. *Canadian Journal of Plant Science*, 55(2), 501–505. <https://doi.org/10.4141/cjps75-076>
4. Arias, J., Rengifo, T., & Jaramillo, M. (2007). Manual técnico: buenas prácticas agrícolas en la producción de frijol voluble. FAO, Corpoica, Gobernación de Antioquia, MANA, Centro de Investigación La Selva. Medellín, Colombia.
5. Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218. <https://doi.org/10.1007/bf02672069>
6. Assefa, T., Beebe, S. E., Rao, I. M., Cuasquer, J. B., Duque, M. C., Rivera, M., Battisti, A., & Lucchin, M. (2013). Pod harvest index as a selection criterion to improve drought resistance in white pea bean. *Field Crops Research*, 148, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.04.008>
7. Atkins, C. A., Kuo, J., & Pate, J. S. (1977). Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum sativum* L.): Distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in relation to pod structure: Distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in relation to pod structure. *Plant Physiology*, 60(5), 779–786. <https://doi.org/10.1104/pp.60.5.779>
8. Baptista, A., Pinho, O., Pinto, E., Casal, S., Mota, C., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L.) from Mozambique. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 11(2), 442–450. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9412-2>
9. Beebe, S. E., Rao, I. M., Blair, M. W., & Acosta-Gallegos, J. A. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*, 4, 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00035>
10. Belmont, R., Bernal, L., Padilla-Chacón, D., Coello, P., & Martínez-Barajas, E. (2022). Starch accumulation in bean fruit pericarp is mediated by the differentiation of chloroplasts into amyloplasts. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 316(111163), 111163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111163>

11. Bennett, E. J., Roberts, J. A., & Wagstaff, C. (2011). The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield: Tansley review. *The New Phytologist*, 190(4), 838–853. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03714.x>
12. Bernal Gracida, L. A., & Martínez Barajas, J. E. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 7(25), 77–90. <https://doi.org/10.26457/recein.v7i25.249>
13. Berny Mier Y Teran, J. C., Konzen, E. R., Palkovic, A., Tsai, S. M., Rao, I. M., Beebe, S., & Gepts, P. (2019). Effect of drought stress on the genetic architecture of photosynthate allocation and remobilization in pods of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), a key species for food security. *BMC Plant Biology*, 19(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1774-2>
14. Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U., & Weber, H. (2004). Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 6(4), 375–386. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817908>
15. Bournay, A. S., Hedley, P. E., Maddison, A., Waugh, R., & Machray, G. C. (1996). Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Research*, 24(12), 2347–2351. <https://doi.org/10.1093/nar/24.12.2347>
16. Boyer, J. S., & McLaughlin, J. E. (2007). Functional reversion to identify controlling genes in multigenic responses: analysis of floral abortion. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 267–277. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl177>
17. Camacho-Espinoza, M. K., Peinado-Guevara, L. I., López-Valenzuela, J. Á., Valdez-Ortiz, Á., Salinas-Pérez, R. A., Moreno-Herrera, C. G., & Medina-Godoy, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus Vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*, 6(1), 23-36.
18. Carbas, B., Machado, N., Oppolzer, D., Ferreira, L., Queiroz, M., Brites, C., Rosa, E. A., & Barros, A. I. (2020). Nutrients, antinutrients, phenolic composition, and antioxidant activity of common bean cultivars and their potential for food applications. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 186. <https://doi.org/10.3390/antiox9020186>
19. Cayetano-Marcial, M. I., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteve, A., Jiménez-Galindo, J. C., Galván Escobedo, I. G., & Padilla-Chacón, D. (2021). Humidity restriction, high night temperature and their combination, during post flowering on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) canopy and pod senescence. *Legume Research-An International Journal*, 44(6), 634-640. <https://doi.org/10.18805/lr-592>
20. Chacón S, M. I., Pickersgill, B., & Debouck, D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), 432–444. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1842-2>

21. Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(8), 1360. <https://doi.org/10.3390/molecules22081360>
22. Chen, L., Lu, D., Wang, T., Li, Z., Zhao, Y., Jiang, Y., Zhang, Q., Cao, Q., Fang, K., Xing, Y., & Qin, L. (2017). Identification and expression analysis of starch branching enzymes involved in starch synthesis during the development of chestnut (*Castanea mollissima* Blume) cotyledons. *PLoS One*, 12(5), e0177792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177792>
23. Chen, L., Liu, X., Huang, X., Luo, W., Long, Y., Greiner, S., Rausch, T., & Zhao, H. (2019). Functional characterization of a drought-responsive invertase inhibitor from maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4081. <https://doi.org/10.3390/ijms20174081>
24. Chen, Z., Gao, K., Su, X., Rao, P., & An, X. (2015). Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus*. *PLoS One*, 10(9), e0138540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138540>
25. Cho y.-H., & Yoo, S.-D. (2011). Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 7(1), e1001263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001263>
26. Chopra, J., Kaur, N., & Gupta, A. K. (2003). Changes in the activities of carbon metabolizing enzymes with pod development in lentil (*Lens culinaris* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(2), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s11738-003-0052-x>
27. Chourey, P. S., Li, Q.-B., & Cevallos-Cevallos, J. (2012). Pleiotropy and its dissection through a metabolic gene *Miniature1* (*Mn1*) that encodes a cell wall invertase in developing seeds of maize. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 184, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.011>
28. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
29. CIAT. (1985). librería digital del CIAT. Etapas de desarrollo de la planta del frijol común. Obtenido de: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/ciat/28093.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/ciat/28093.pdf)
30. CIAT. (1992). Manejo agronómico del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Unidades de aprendizaje para la capacitación en tecnología de producción de frijol. 1-15.
31. Ciereszko, I. (2018). Regulatory roles of sugars in plant growth and development. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae. Polskie Towarzystwo Botaniczne*, 87(2). <https://doi.org/10.5586/asbp.3583>
32. Clavijo Michelangeli, J. A., Bhakta, M., Gezan, S. A., Boote, K. J., & Vallejos, C. E. (2013). From flower to seed: identifying phenological markers and reliable growth

- functions to model reproductive development in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Flower to seed: reproductive growth of *P. vulgaris*. *Plant, Cell & Environment*, 36(11), 2046–2058. <https://doi.org/10.1111/pce.12114>
33. Coelho, C. M. M., & Benedito, V. A. (2008). Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed science and biotechnology*, 2(2), 42-52.
  34. Coello, P., & Martínez-Barajas, E. (2014). The activity of SnRK1 is increased in *Phaseolus vulgaris* seeds in response to a reduced nutrient supply. *Frontiers in Plant Science*, 5, 196. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00196>
  35. Cortés-Romero, C., Martínez-Hernández, A., Mellado-Mojica, E., López, M. G., & Simpson, J. (2012). Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. *PloS One*, 7(4), e35878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035878>
  36. Cuellar-Ortiz, S. M., De La Paz Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., & Covarrubias, A. A. (2008). Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, Cell & Environment*, 31(10), 1399–1409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x>
  37. Cumino, A., Curatti, L., Giarrocco, L., & Salerno, G. L. (2002). Sucrose metabolism: Anabaena sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase define minimal functional domains shuffled during evolution. *FEBS Letters*, 517(1–3), 19–23. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02516-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02516-4)
  38. Du y., Zhao, Q., Chen, L. yao, X., Zhang, H., Wu, J., & Xie, F. (2020). Effect of drought stress during soybean R2-R6 growth stages on sucrose metabolism in leaf and seed. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 618. <https://doi.org/10.3390/ijms21020618>
  39. Ekstrom, A., Taujale, R., McGinn, N., & Yin y. (2014). PlantCAZyme: a database for plant carbohydrate-active enzymes. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau079>
  40. Estrada, J. A., Estrada, V., Molina, J. C., & Campos, A. (2004). OTI, una nueva variedad de frijol para el valle de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(1), 115–116.
  41. Eveland, A. L., & Jackson, D. P. (2012). Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3367–3377. <https://doi.org/10.1093/jxb/err379>
  42. Furbank, R. T., White, R., Palta, J. A., & Turner, N. C. (2004). Internal recycling of respiratory CO<sub>2</sub> in pods of chickpea (*Cicer arietinum* L.): the role of pod wall, seed coat, and embryo. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1687–1696. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh190>

43. Gallardo, K., Thompson, R., & Burstin, J. (2008). Reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.017>
44. Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>
45. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. 571–607.
46. Geiger, D. (2020). Plant glucose transporter structure and function. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 472(9), 1111–1128. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02449-3>
47. Goetz, M., Rabinovich, M., & Smith, H. M. (2021). The role of auxin and sugar signaling in dominance inhibition of inflorescence growth by fruit load. *Plant Physiology*, 187(3), 1189–1201. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab237>
48. Golam Masu, A. S. M., Khandaker, L., Berthold, J., Gates, L., Peters, K., Delong, H., & Hossain, K. (2011). Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American journal of food technology*, 6(5), 385–394. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.385.394>
49. Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
50. Goodstein, D., Shengqiang, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R., Fazo, J., & Rokhsar, D. (20 de enero de 2022). Phytozome 13- The plant genomics resource. Obtenido de <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>
51. Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J., & Paredes-López, O. (2000). Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1874–1881. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010))
52. Hageman, A., & Van Volkenburgh, E. (2021). Sink strength maintenance underlies drought tolerance in common bean. *Plants*, 10(3), 489. <https://doi.org/10.3390/plants10030489>
53. Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Reyes-Vázquez, I., & Mendoza-Núñez, M. A. (2017). Composición química y degradaciones in vitro de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 105. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>

54. Herrera-Flores, T., del Carmen Mendoza Castillo, M., Gallegos, J. A. A., Cárdenas Soriano, E., & Ortiz-Cereceres, J. (2005). Anatomía de la vaina de tres especies del género *Phaseolus*. *Agrociencia* (1996), 39(6), 595–602.
55. Ji, X. M., Raveendran, M., Oane, R., Ismail, A., Lafitte, R., Bruskiwich, R., Cheng, S. H., & Bennett, J. (2005). Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall invertase genes of rice at flowering. *Plant Molecular Biology*, 59(6), 945–964. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2415-8>
56. Jiménez Galindo, J. C., & Acosta Gallegos, J. A. (2013). Evaluation of the yield of common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) beans with the irrigation-drought method in Chihuahua. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4), 599–610.
57. Juárez-Colunga, S., López-González, C., Morales-Elías, N. C., Massange-Sánchez, J. A., Trachsel, S., & Tiessen, A. (2018). Genome-wide analysis of the invertase gene family from maize. *Plant Molecular Biology*, 97(4–5), 385–406. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0746-5>
58. Kaur, H., Manna, M., Thakur, T., Gautam, V., & Salvi, P. (2021). Imperative role of sugar signaling and transport during drought stress responses in plants. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 833–848. <https://doi.org/10.1111/ppl.13364>
59. Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
60. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
61. Lammens, W., Le Roy, K., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2008). Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.074>
62. Leonardos, E. D., Micallef, B. J., Micallef, M. C., & Grodzinski, B. (2006). Diel patterns of leaf C export and of main shoot growth for *Flaveria linearis* with altered leaf sucrose-starch partitioning. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 801–814. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj063>
63. Li, C., Rudi, H., Stockinger, E. J., Cheng, H., Cao, M., Fox, S. E., Mockler, T. C., Westereng, B., Fjellheim, S., Rognli, O. A., & Sandve, S. R. (2012). Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *BMC Plant Biology*, 12(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-65>
64. Li, N., Xu, R., Duan, P., & Li, Y. (2018). Control of grain size in rice. *Plant Reproduction*, 31(3), 237–251. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0333-6>

65. Liao, S., Wang, L., Li, J., & Ruan y.-L. (2020). Cell wall invertase is essential for ovule development through sugar signaling rather than provision of carbon nutrients. *Plant Physiology*, 183(3), 1126–1144. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00400>
66. Liu y.-H., Cao, J.-S., Li, G.-J., Wu, X.-H., Wang, B.-G., Xu, P., Hu, T.-T., Lu, Z.-F., Patrick, J. W., & Ruan y.-L. (2012). Genotypic differences in pod wall and seed growth relate to invertase activities and assimilate transport pathways in asparagus bean. *Annals of Botany*, 109(7), 1277–1284. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs060>
67. Lloyd, J. R., Kossmann, J., & Ritte, G. (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science*, 10(3), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.001>
68. López-González, C., Juárez-Colunga, S., Morales-Elías, N. C., & Tiessen, A. (2019). Exploring regulatory networks in plants: transcription factors of starch metabolism. *PeerJ*, 7(e6841), e6841. <https://doi.org/10.7717/peerj.6841>
69. Macovei, A., Pagano, A., Cappuccio, M., Gallotti, L., Dondi, D., De Sousa Araujo, S., Fevereiro, P., & Balestrazzi, A. (2019). A snapshot of the trehalose pathway during seed imbibition in *Medicago truncatula* reveals temporal- and stress-dependent shifts in gene expression patterns associated with metabolite changes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01590>
70. Matilla, A. J. (2016). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2, 549.
71. McLaughlin, J. E., & Boyer, J. S. (2004). Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. *Annals of Botany*, 94(5), 675–689. <https://doi.org/10.1093/aob/mch193>
72. Mederos y. (2006). Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 27(3), 55–62.
73. Minami, A., Kang, X., & Carter, C. J. (2021). A cell wall invertase controls nectar volume and sugar composition. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 107(4), 1016–1028. <https://doi.org/10.1111/tpj.15357>
74. Montero Tavera, V., Gutiérrez-Benicio, G. M., Mireles-Arriaga, A. I., Aguirre-Mancilla, C. L., Acosta-Gallegos, J. A., & Ruiz Nieto, J. E. (2019). Efectos fisiológicos del estrés hídrico en variedades de frijol tolerantes a la sequía. *Acta universitaria*, 29, 1–7. <https://doi.org/10.15174/au.2019.1816>
75. Morales-Elias, N. C., Martínez-Barajas, E., Bernal-Gracida, L. A., García-Esteva, A., Peña-Valdivia, C. B., & Padilla-Chacón, D. (2021). 14 C-Partitioning and biomass allocation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different moisture levels during pod filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, jac.12550. <https://doi.org/10.1111/jac.12550>

76. Morales-Rosales, E. J., Escalante-Estrada, J. A. S., & López-Sandoval, J. A. (2008). Growth, harvest index and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in sole crop and in intercropped with sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Universidad y Ciencia*, 24(1), 1–10.
77. Muñoz, F. J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M. T., Viale, A. M., Etxeberria, E., Alonso-Casajús, N., & Pozueta-Romero, J. (2005). Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant & Cell Physiology*, 46(8), 1366–1376. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci148>
78. Müntz, K. (1977). Isoenzymes of  $\alpha$ -amylase during pod development of field beans. *Phytochemistry*, 16(10), 1491-1494.
79. Neumann, K., Klukas, C., Friedel, S., Rischbeck, P., Chen, D., Entzian, A., Stein, N., Graner, A., & Kilian, B. (2015). Dissecting spatiotemporal biomass accumulation in barley under different water regimes using high-throughput image analysis: Biomass accumulation in barley. *Plant, Cell & Environment*, 38(10), 1980–1996. <https://doi.org/10.1111/pce.12516>
80. Padilla-Chacón, D., Martínez-Barajas, E., García-Esteva, A., Leal-Delgado, R., Kohashi-Shibata, J., & Peña-Valdivia, C. B. (2017). Biomass remobilization in two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars under water restriction. *South African Journal of Botany*, 112, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.015>
81. Parreira, J. R., Bouraada, J., Fitzpatrick, M. A., Silvestre, S., Bernardes da Silva, A., Marques da Silva, J., Almeida, A. M., Fevereiro, P., Altelaar, A. F. M., & Araújo, S. S. (2016). Differential proteomics reveals the hallmarks of seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, 143, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.002>
82. Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, J. R., Aguirre, J. R. R. ybarra-Moncada, M. C., & López, M. H. (2011). Variation in physical and chemical characteristics of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grain along a domestication gradient. *Chemistry & Biodiversity*, 8(12), 2211–2225. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100102>
83. Pfister, B., & Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(14), 2781–2807. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2250-x>
84. Proels, R. K., & Roitsch, T. (2009). Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1555–1567. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp027>
85. Qi, X., Wu, Z., Li, J., Mo, X., Wu, S., Chu, J., & Wu, P. (2007). AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 64(5), 575–587. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9177-4>

86. Qian, W. yue, C., Wang y., Cao, H., Li, N., Wang, L., Hao, X., Wang, X., Xiao, B., & Yang y. (2016). Identification of the invertase gene family (INVs) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 35(11), 2269–2283. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2033-8>
87. Qu, J., Xu, S., Zhang, Z., Chen, G., Zhong y., Liu, L., Zhang, R., Xue, J., & Guo, D. (2018). Evolutionary, structural and expression analysis of core genes involved in starch synthesis. *Scientific® Reports*, 8(1), 12736. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30411-y>
88. Rajendran, K., Tester, M., & Roy, S. J. (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 32(3), 237–249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01916.x>
89. Raya-Pérez, J. C., Gutiérrez-Benicio, G. M., Ramírez-Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J., & Aguirre-Mancilla, C. L. (2014). Caracterización de proteínas y contenido mineral de dos variedades nativas de frijol de México. *Agronomía mesoamericana*, 25(1), 1. <https://doi.org/10.15517/am.v25i1.14185>
90. Reeve, R. M., & Brown, M. S. (1968). Histological development of the Green bean pod as related to culinary texture: 1. Early stages of pod development. *Journal of Food Science*, 33(3), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb01378.x>
91. Rende, U., Wang, W., Gandla, M. L., Jönsson, L. J., & Niittylä, T. (2017). Cytosolic invertase contributes to the supply of substrate for cellulose biosynthesis in developing wood. *The New Phytologist*, 214(2), 796–807. <https://doi.org/10.1111/nph.14392>
92. Rezende, A. A., Pacheco, M. T. B., Silva, V. S. N. da, & Ferreira, T. A. P. de C. (2017). Nutritional and protein quality of dry Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology*, 38(0), 421–427. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.05917>
93. Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 513–524. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg050>
94. Roitsch, T., Bittner, M., & Godt, D. E. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, 108(1), 285–294. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.285>
95. Ruan y.-L. (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>
96. Ruzin, S. E. (1999). *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press 322p.

97. SAGARPA. (2017). Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Guía técnica para la descripción varietal, 5-21.
98. Salter, P. J., & Goode, J. E. (1967). Crop responses to water at different stages of growth. *The Quarterly Review of Biology*, 44(4), 421–422. <https://doi.org/10.1086/406296>
99. Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
100. Sehgal, A., Sita, K., Siddique, K. H. M., Kumar, R., Bhogireddy, S., Varshney, R. K., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Prasad, P. V. V., & Nayyar, H. (2018). Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: Impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1705. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01705>
101. Sengupta, D., Kariyat, D., Marriboina, S., & Reddy, A. R. (2019). Pod-wall proteomics provide novel insights into soybean seed-filling process under chemical-induced terminal drought stress: Pod-wall proteomics and soybean seed-filling process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2481–2493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9457>
102. Shen, S., Ma, S., Liu y., Liao, S., Li, J., Wu, L., Kartika, D., Mock, H.-P., & Ruan y.-L. (2019). Cell wall invertase and sugar transporters are differentially activated in tomato styles and ovaries during pollination and fertilization. *Frontiers in Plant Science*, 10, 506. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00506>
103. Sherson, S. M., Alford, H. L., Forbes, S. M., Wallace, G., & Smith, S. M. (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 525–531. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg055>
104. Shokat, S., Großkinsky, D. K., Roitsch, T., & Liu, F. (2020). Activities of leaf and spike carbohydrate-metabolic and antioxidant enzymes are linked with yield performance in three spring wheat genotypes grown under well-watered and drought conditions. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02581-3>
105. Siemens, J., González, M.-C., Wolf, S., Hofmann, C., Greiner, S., Du y., Rausch, T., Roitsch, T., & Ludwig-Müller, J. (2011). Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*: Invertase and clubroot disease. *Molecular Plant Pathology*, 12(3), 247–262. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00667.x>
106. Singal, H. R., Laura, J. S., & Singh, R. (1993). Photosynthetic carbon reduction cycle metabolites and enzymes of sucrose and starch biosynthesis in developing *Brassica* pods. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 30(5), 270–276.

107. Singal, H. R., Talwar, G., Dua, A., & Singh, R. (1995). Pod photosynthesis and seed dark CO<sub>2</sub> fixation support oil synthesis in developing Brassica seeds. *Journal of Biosciences*, 20(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/bf02711580>
108. Slewinski, T. L., Garg, A., Johal, G. S., & Braun, D. M. (2010). Maize SUT1 functions in phloem loading. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 687–690. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11575>
109. Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2020). Starch: A flexible, adaptable carbon store coupled to plant growth. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 217–245. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100241>
110. Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154. <https://doi.org/10.1007/bf01347224>
111. Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J. G., Kok, M. T., Pijnenburg, M., Recourt, K., Derksen, J., & Voragen, A. G. (1999). Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiology*, 121(2), 363–372. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.363>
112. Sturm, A. (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121(1), 1–8. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.1>
113. Sturm, Arnd, Hess, D., Lee, H.-S., & Lienhard, S. (2002). Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiologia Plantarum*, 107(2), 159–165. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100202.x>
114. Taliercio, E., Scheffler, J., & Scheffler, B. (2010). Characterization of two cotton (*Gossypium hirsutum* L) invertase genes. *Molecular Biology Reports*, 37(8), 3915–3920. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0048-8>
115. Tang, G. Q., Lüscher, M., & Sturm, A. (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant Cell*, 11(2), 177–189. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.2.177>
116. Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00293>
117. Thomas, H., & Ougham, H. (2014). The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3889–3900. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru037>
118. Tiessen, A., & Padilla-Chacon, D. (2012). Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. *Frontiers in Plant Science*, 3, 306. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00306>

119. Tofiño, A., Romero, H. M., & Ceballos, H. (2007). Effect of abiotic stress on starch synthesis and degradation. A review. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 245–254.
120. Vargas, W., Cumino, A., & Salerno, G. L. (2003). Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, 216(6), 951–960. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0943-x>
121. Vargas-Ortiz, E., Espitia-Rangel, E., Tiessen, A., & Délano-Frier, J. P. (2013). Grain amaranths are defoliation tolerant crop species capable of utilizing stem and root carbohydrate reserves to sustain vegetative and reproductive growth after leaf loss. *PloS One*, 8(7), e67879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067879>
122. Vlasova, A., Capella-Gutiérrez, S., Rendón-Anaya, M., Hernández-Oñate, M., Minoche, A. E., Erb, I., Câmara, F., Prieto-Barja, P., Corvelo, A., Sanseverino, W., Westergaard, G., Dohm, J. C., Pappas, G. J., Jr, Saburido-Alvarez, S., Kedra, D., Gonzalez, I., Cozzuto, L., Gómez-Garrido, J., Aguilar-Morón, M. A., & Guigó, R. (2016). Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology*, 17(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0883-6>
123. Wang, E., Wang, J., Zhu, X., Hao, W., Wang, L., Li, Q., Zhang, L., He, W., Lu, B., Lin, H., Ma, H., Zhang, G., & He, Z. (2008). Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*, 40(11), 1370–1374. <https://doi.org/10.1038/ng.220>
124. Wang, H., Hou, L., Wang, M., & Mao, P. (2016). Contribution of the pod wall to seed grain filling in alfalfa. *Scientific® Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep26586>
125. Wang, H., Zhou, Q., & Mao, P. (2020). Ultrastructural and photosynthetic responses of pod walls in alfalfa to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4457. <https://doi.org/10.3390/ijms21124457>
126. Wang, L., & Ruan y.-L. (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science*, 4, 163. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00163>
127. Wang, L., Zheng y., Ding, S., Zhang, Q., Chen y., & Zhang, J. (2017). Molecular cloning, structure, phylogeny and expression analysis of the invertase gene family in sugarcane. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1052-0>
128. Weil, M., Krausgrill, S., Schuster, A., & Rausch, T. (1994). A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta*, 193(3), 438–445. <https://doi.org/10.1007/bf00201824>
129. Welham, T., Pike, J., Horst, I., Fliemetakakis, E., Katinakis, P., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Parniske, M., & Wang, T. L. (2009). A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus*

- japonicus. *Journal of Experimental Botany*, 60(12), 3353–3365. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp169>
130. Wingler, A., & Roitsch, T. (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 1, 50–62. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00086.x>
131. Yin, S., Li, P., Xu y., Liu, J. yang, T., Wei, J., Xu, S. yu, J., Fang, H., Xue, L., Hao, D. yang, Z., & Xu, C. (2020). Genetic and genomic analysis of the seed-filling process in maize based on a logistic model. *Heredity*, 124(1), 122–134. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0251-x>
132. Yoon, J., Cho, L.-H., Tun, W., Jeon, J.-S., & An, G. (2021). Sucrose signaling in higher plants. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 302(110703), 110703. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110703>
133. Zeeman, S. C., Smith, S. M., & Smith, A. M. (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *The Biochemical Journal*, 401(1), 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20061393>
134. Zhang, Shuang, Ghatak, A., Bazargani, M. M., Bajaj, P., Varshney, R. K., Chaturvedi, P., Jiang, D., & Weckwerth, W. (2021). Spatial distribution of proteins and metabolites in developing wheat grain and their differential regulatory response during the grain filling process. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 107(3), 669–687. <https://doi.org/10.1111/tpj.15410>
135. Zhang, Suling, Zhang, Z., Sun, X., Liu, Z., Ma, M., Fan, J., Luo, W., Wang, L., & Zhang, S. (2021). Identification and characterization of invertase family genes reveal their roles in vacuolar sucrose metabolism during *Pyrus bretschneideri* Rehd. fruit development. *Genomics*, 113(3), 1087–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.028>
136. Zhou, L., & Paull, R. E. (2001). Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya*) fruit growth and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 126(3), 351–357. <https://doi.org/10.21273/jashs.126.3.351>